

**Nachweis von non-HLA-Antikörpern gegen
monozytäre Antigene mit Hilfe der
Durchflußzytometrie bei Patienten vor und nach
Nierentransplantation**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctore medicinae (Dr.med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich- Schiller- Universität Jena

von **Kristin Süßenguth**
geboren am 14.Mai 1975
in Lobenstein

1. Gutachter: Prof. Dr. D. Barz
2. Gutachter: PD Dr. T. Steiner
3. Gutachter: Prof. Dr. V. Kiefel

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.07.2007

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
Ak	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BD	Becton Dickinson
C1q	Komplementfaktor 1q
CD	„cluster of differentiation“
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CTL	zytotoxische T- Zellen
DC	dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	quantitative Nachweismethode für Antigene oder Antikörper, die auf Kopplung mit Enzymen beruht
FACS	Durchflußzytometer
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
HLA	humanes Leukozytenantigensystem
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig G/ M	Immunglobulin der Klasse G/ Klasse M
kB	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
Koll.	Kollektiv
LCT	Lymphozytotoxischer Test
LAMP-3	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein-3
LFA-1	Leukozyten-spezifisches Integrin
LMP	multifunctionales Proteosomen
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MLA-1	Melanozytenantigen-1
mAk	monoklonale Antikörper
NK	Natürliche Killerzelle
NTX	Nierentransplantation
Pat.	Patient
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PE	Phycoerythin
PETA-3	Thrombozyten Endotheliales Tetraspanin Antigen
SSC	Seitwärtsstreulicht
TAP	Transporter assoziiert mit Antigen-Prozessierung
TH	T- Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 DIE NIERENTRANSPLANTATION	3
2.2 TRANSPLANTATABSTOßUNGEN.....	4
2.2.1 Transplantationsantigene.....	4
2.2.2 Abstoßungsreaktionen und Abstoßungsimmunologie	10
3 ZIELE DER ARBEIT	13
4 MATERIALIEN UND METHODEN	14
4.1 MATERIALIEN.....	14
4.1.1 Lösungen für FACS- Färbungen.....	14
4.1.2 Monoklonale Antikörper	14
4.1.3 Seren	16
4.1.4 Monozytenspender	16
4.1.5 Verbrauchsmaterialien	17
4.1.6 Geräte.....	17
4.2. GRUNDLAGEN UND AUFBAU DES DURCHFLUßZYTOMETERS	17
4.3 DURCHFLUßZYTOMETRISCHE MESSUNGEN	19
4.3.1 Voreinstellungen des Durchflußzytometers	19
4.3.2 Fluoreszenzfärbung der Zellen	20
4.3.3 Ansatz für die Festlegung der Ausgangsfluoreszenz.....	22
4.3.4 Ansatz zur Bestimmung von non-HLA-Ak in Seren von nierentransplantierten Patienten	23
4.3.5 Ansatz für die Positivkontrolle.....	23
4.3.6 Ansatz ohne fluoreszenzmarkierten mAk (Leeransatz).....	24
4.4 DARSTELLUNGEN AM DURCHFLUßZYTOMETER UND AUSWERTUNGEN DER DATEN.....	24
5 ERGEBNISSE.....	27
5.1 PATIENTEN.....	27
5.2 BESTIMMUNGEN EINES GEEIGNETEN MONOZYTENSPENDERS.....	35
5.3 DURCHFLUßZYTOMETRISCHER NACHWEIS DER EXPRESSION DER ANTIGENE CD63, CDw92, CD93, CD102 UND CD151 AUF MONOZYTEN.....	37

5.4 BESTIMMUNG DER NACHWEISGRENZE VON CD63, CDW92, CD93, CD102 UND CD151 ANTIKÖRPERN MIT DER DURCHFLUßZYTOMETRIE	39
5.5 FEHLENDER NACHWEIS VON NON-HLA-AK GEGEN AUSGEWÄHLTE EPITOPE AUF DEN ADHÄSIONSMOLEKÜLEN CD63, CDW92, CD93, CD102 UND CD151 IN PATIENTENSEREN VOR UND NACH NIERENTRANSPLANTATION	45
6 DISKUSSION.....	57
6.1 NON-HLA-AK UND ABSTOßUNGSREAKTIONEN.....	58
6.2 GENPOLYMORPHISMUS UND MÖGLICHE MODIFIKATIONEN DER UNTERSUCHTEN EPITOPE DER MONOZYTÄREN ADHÄSIONSMOLEKÜLE CD63, CDW92, CD93, CD102 UND CD151	61
6.3 DISKUSSION DER DURCHFLUßZYTOMETRIE ALS METHODE DER WAHL ZUM NACHWEIS VON NON-HLA-ANTIKÖRPERN	63
7 SCHLUSSFOLGERUNGEN	66
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	67
ANHANG	

1 Zusammenfassung

Als Ursache für Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen bei Patienten, die mit ihrem Spender in den HLA-Antigenen völlig übereinstimmen, werden non-HLA-Ak diskutiert, die sich z.B. gegen monozytäre und endotheliale Antigene richten. Dabei ist nicht nur das Spektrum der betroffenen Antigene bisher nur ansatzweise ermittelt worden, sondern auch die Epitope, die von den non-HLA-Ak auf diesen Antigenen determiniert werden, sind unbekannt. Derartige Epitope können entstehen, wenn die kodierenden Gene im Epitopbereich bei den Individuen polymorph strukturiert sind oder sich die Individuen durch differente posttranslationale Modifikationen im Epitopbereich unterscheiden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es mit durchflußzytometrischen Methoden in Seren von 37 Patienten vor und nach Nierentransplantation non-HLA-Ak nachzuweisen, die sich gegen definierte Epitope auf den monozytären Adhäsionsmolekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 richten. Die Patienten wurden aufgrund des unterschiedlichen postoperativen Verlaufes in drei Kollektive unterteilt. Kollektiv 1 bildete die Gruppe der Patienten mit akuter Abstoßungsreaktion, Kollektiv 2 zeigte eine verzögerte Funktionsaufnahme und Kollektiv 3 eine Sofortfunktion des Transplantates nach NTX.

Non-HLA-Ak gegen die ausgewählten Epitope der monozytären Adhäsionsmoleküle CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 konnten in den Seren vor und nach Transplantation nicht bestimmt werden. Daraus ergibt sich, dass als Ursache für die akute Rejektion und für die verzögerte Funktionsaufnahme keine non-HLA-Ak gegen die hier untersuchten Epitope in Frage kommen. Wahrscheinlich detektieren die ausgewählten Antikörper Epitope, die durch Genpolymorphismus nicht verändert werden und in Regionen liegen, die nicht posttranslational modifiziert werden.

Der fehlende Nachweis von non-HLA-Ak gegen die ausgewählten Epitope auf den Adhäsionsmolekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 könnte auch auf der Tatsache beruhen, dass die Durchflußzytometrie für den Nachweis derartiger Antikörper als Methode zu unsensibel ist. Diese Annahme muss allerdings eher verworfen werden, denn die Ergebnisse

dieser Arbeit zeigen, dass die Durchflußzytometrie eine hochsensitive und damit äußerst geeignete Methode ist, um non-HLA-Ak nachzuweisen.

Da in der vorliegenden Arbeit keine non-HLA-Ak gefunden werden konnten, die durch die mAk H5C6, VIM15, X-2, B-T1 und 14A2H1 auf den Molekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 vorgegeben wurden, ergibt sich, dass diese Epitope für die routinemäßige Austestung auf non-HLA-Ak in Patientenseren eher unzweckmäßig sind. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass sich auf diesen Molekülen Epitope befinden, die als Ziel für non-HLA-Ak agieren. Weitere Untersuchungen unter Verwendung von anderen mAk gegen die aufgeführten Adhäsionsmoleküle können zur Lokalisation von derartigen Epitopen führen.

Durch Identifizierung dieser Epitope kann die Voraussetzung geschaffen werden, die zugehörigen kodierenden polymorphen Genabschnitte zu finden. Schließlich kann durch die genaue Typisierung dieser Genabschnitte die Auswahl von Nierentransplantatspender und -empfänger deutlich verbessert werden und somit die auf non-HLA-Antikörperbildung beruhenden Komplikationen nach Nierentransplantation entscheidend reduziert werden.

2 Einleitung

2.1 Die Nierentransplantation

Jährlich erkranken immer mehr Patienten an einer chronischen Niereninsuffizienz. Die Ursachen sind vielfältig. Am häufigsten führen die chronische Glomerulonephritis (25%), diabetische Nephropathie (21%), chronische Pyelonephritis und chronische interstitielle Nephritis (ca.17%), vaskuläre Nephropathien (9%), Zystennieren (9%) und verschiedene andere Systemerkrankungen zu einem chronischen Nierenversagen (Krautzig, 2000). Im Verlauf der CNI kommt es langsam zu einem progredienten Untergang von funktionsfähigem Nierengewebe. Als Folge resultieren die Abnahme des Glomerulumfiltrates und der Anstieg von Retentionswerten im Blut. Durch die zunehmende Funktionseinschränkung kommt es schließlich zur terminalen Niereninsuffizienz, welche unbehandelt zum Tode führt und eine Nierenersatztherapie durch Dialyse oder Transplantation unumgänglich macht.

Bedingt durch die dauerhafte Stoffwechsellage und den damit verbundenen Folgeschäden beeinträchtigt die Dialyse im Vergleich zur Transplantation den Patienten über die Behandlungsjahre hinweg in der Leistungsfähigkeit und der Lebensqualität (Thiel, 1991). Auch die Mortalität von Dialysepatienten ist kurzfristig minimal, langfristig jedoch deutlich höher als die von transplantierten Patienten (Dreikorn, 1994). Die Nierentransplantation als Ersatz des nicht funktionierenden Organs stellt laut Evans die Therapie mit der höchsten Lebensqualität für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz dar und hat sich somit zu einer erfolgreichen Therapieform neben der Dialyse und Hämofiltration etabliert (Evans et al., 1998). In Deutschland warten zurzeit mehr als 8800 der ca. 50000 Dialysepatienten auf ein Spenderorgan und die Zahl steigt stetig. Allein im Jahr 2005 wurden in Deutschland 2712 Nieren transplantiert (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2006).

Dank des medizinischen Fortschritts und der erweiterten Behandlungsmöglichkeiten einschließlich Betreuung der Transplantatempfänger verbesserten sich die Erfolgsaussichten

für das Überleben des Transplantates kontinuierlich. So sind nach einem Jahr bei postmortaler Spende noch 83%, bei Lebendspende bis zu 93% der Nierentransplantate intakt. Die Fünf- Jahres- Überlebensrate liegt bei der Transplantation von Organen lebender Spender bei 84% und bei Organen verstorbener Spender bei 71% (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2006).

Untersuchungen in den vergangenen 30 Jahren haben gezeigt, dass der Transplantationserfolg von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Wichtige Kriterien dabei sind die Qualität des Spenderorgans, die immunologische Reaktivität des Empfängers, die Histokompatibilität und die immunsuppressive Therapie. Durch die Optimierung der Transplantatbedingungen und den Einsatz der immunsuppressiven Therapie konnte die Zahl der Nierentransplantatabstoßungen in den letzten Jahren deutlich reduziert werden. Trotz Berücksichtigung oben genannter Faktoren kommt es weiterhin zu vaskulären Abstoßungsreaktionen, deren Verlauf für das Überleben oder den Untergang des Nierentransplantates entscheidend ist. Vor allem die Überwindung der immunologischen Barriere zwischen Organspender und Organempfänger stellt dabei ein zentrales Problem der Nierentransplantation dar.

2.2 Transplantatabstoßungen

2.2.1 Transplantationsantigene

Als Transplantationsantigene werden Moleküle bezeichnet, die in der Zellmembran von Geweben oder Blutzellen exprimiert werden und nach Transplantation innerhalb derselben Spezies eine Antikörperbildung hervorrufen können. Diese Antikörperbildung kann schließlich zu einer Transplantatabstoßung führen. Als Transplantationsantigene fungieren Blutgruppenantigene, HLA- und non- HLA- Antigene.

Die Blutgruppenantigene zählen zu den Polysaccharid-Antigenen, die extrem immunogen sind. Alle Körperzellen exprimieren die Blutgruppenantigene, so dass bei einer blutgruppeninkompatiblen Transplantation mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Abstoßungsreaktion ausgelöst wird. Aufgrund

dieser Tatsache wird heutzutage meistens blutgruppenkompatibel transplantiert. Dies gilt auch für die Nierentransplantation. Antigene, die durch den Haupthistokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex, MHC) determiniert werden, nehmen die wichtigste Rolle bei der Transplantation ein. Sie werden beim Menschen als HLA- Antigene bezeichnet, da diese Gewebean Antigene zuerst auf Leukozyten (human leukocyte antigens) entdeckt worden sind.

Der HLA- Komplex ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisiert und umfasst einen Genabschnitt von etwa 3800 Kilobasen (Abb.1). Innerhalb des Komplexes werden 3 Antigenklassen unterschieden. Die HLA-Klasse I Antigene umfassen HLA-A, -B, -C, -E, -H, -G und -F Antigene. Die HLA-Klasse II Antigengruppe umfasst die HLA-DP, -DQ, -DR, TAP1, TAP2 und LMP Antigene. Die HLA-Klasse III Antigene spezifizieren Zytokine (z.B. TNF) und Komplementfaktoren (Kiefel und Greinacher, 2005). Sie besitzen zwar immunologische Relevanz, sind aber weder Klasse I noch Klasse II zuzuordnen und werden allein wegen ihrer Lage auf dem Chromosom 6 als HLA-Gene bezeichnet.

Für die Nierentransplantation ist eine gute Übereinstimmung der HLA-Antigene relevant, wobei vor allem HLA-DR, HLA-B und HLA-A die größte Bedeutung zukommt. Das DR-Matching ist allerdings einer der wichtigsten Faktoren für ein langes Transplantatüberleben (Opelz et al., 1991)

Die HLA-Gene sind seit Jahren durch ihre ausgeprägte Vielgestaltigkeit (multiple Allelie) charakterisiert. In der Nomenklatur des WHO Normenclature Committee von 2004 werden serologisch 28 HLA-Klasse I A Allele, 62 HLA-Klasse I B Allele, 10 HLA-Klasse I CW Allele, 6 HLA-Klasse II DPw Allele, 9 HLA-Klasse II DQ Allele und 24 HLA-Klasse II DR Allele beschrieben. Durch molekularbiologische Methoden erhöht sich die Zahl auf 1180 HLA-Klasse I Allele und auf 732 Klasse II Allele (Schreuder et al., 2004). Dieser extreme Polymorphismus erschwert bei der Spender-Empfänger-Auswahl z. B. eine HLA-identische Nierentransplantation zu realisieren.

Im immunologischen Geschehen üben HLA-Moleküle eine Schlüsselfunktion aus. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Proteinspaltprodukte (= Peptide) im Inneren der Zelle aufzunehmen, an die Zelloberfläche zu transportieren und dort den T-Lymphozyten des körpereigenen Abwehrsystems zugänglich zu

machen. Die Einteilung des HLA- Komplexes in 2 Klassen spiegelt die strukturellen Unterschiede wider, auf denen die funktionellen Differenzen im Bereich der Antigenprozessierung und -präsentation basieren.

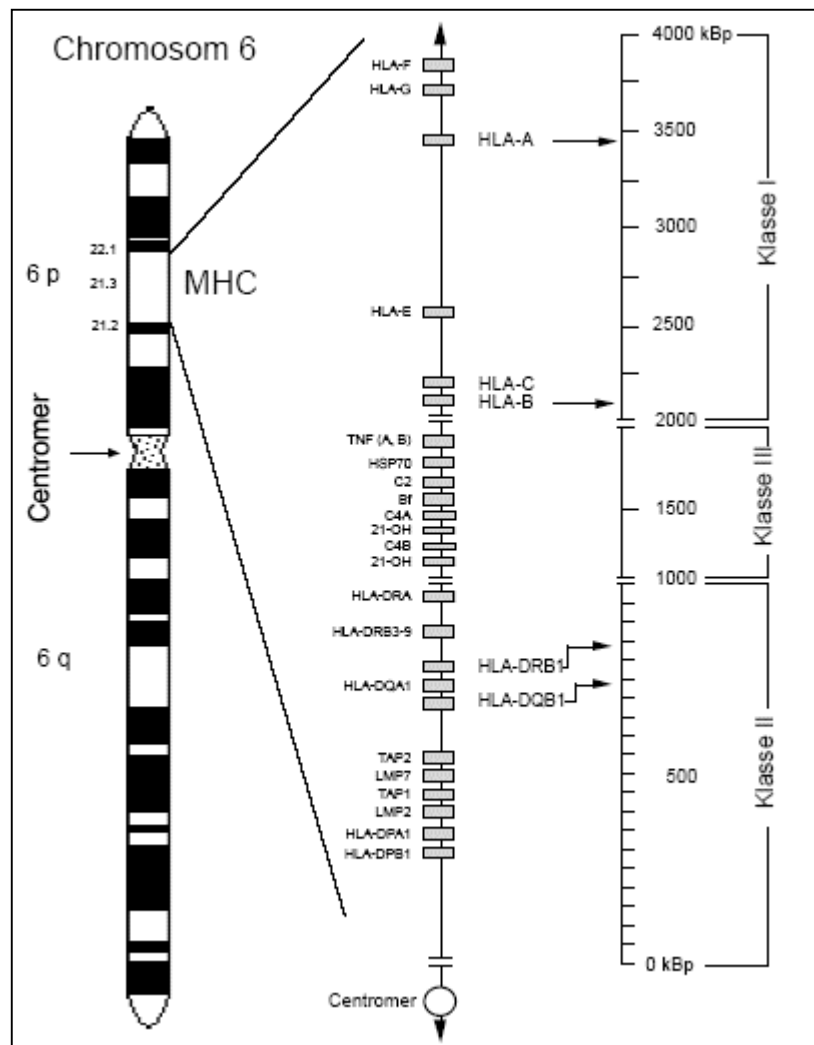


Abbildung 1: Anordnung der HLA-Gene auf Chromosom 6 (aus Grosse- Wild und Oettinger, 1998)

HLA-Klasse I Moleküle binden in ihrer Antigenbindungsgrube ein aus 8 bis 9 Aminosäuren bestehendes Peptid. Bei diesen gebundenen Peptiden handelt es sich um Fragmente von intrazellulär vorkommenden, zumeist zytoplasmatischen oder nukleären Proteinen, die durch Proteolyse gespalten worden sind. Der Komplex aus Peptid und HLA-Klasse I Molekül wird durch den T-Zellrezeptor von CD8+ T-Zellen erkannt. Befindet sich in der Antigenbindungsgrube des HLA- Klasse I Moleküls ein körperfremdes Peptid, wie z.B. ein virales Peptid, so werden CD8+ T-Zellen aktiviert und dadurch eine zytotoxische Immunreaktion initiiert.

HLA-Klasse II Moleküle nehmen in ihrer Antigenbindungsgrube Peptide mit einer Länge von 13 bis 22 Aminosäuren auf. Dabei stammen die Peptide von extrazellulären Proteinen ab, die durch Phagozytose oder Pinozytose aufgenommen worden sind. Anschließend erfolgt die Prozessierung und Beladung der HLA-Klasse II Moleküle mit den Peptiden. Die Peptide werden den CD4+ T-Zellen präsentiert. Peptide, die von körperfremden Proteinen abstammen, wie z.B. bakterielle Proteine, aktivieren die CD4+ T-Zellen und lösen somit eine T-Helfer-Zellen modulierte Immunantwort aus. Hierbei differenzieren sich die T-Helfer-Zellen zu TH-1- und TH-2-Zellen. Die Immunantwort, die zur Folge hat, dass TH-1-Zellen gebildet werden führt zur zellulären Immunität, während eine TH-2-Antwort zur humoralen, d.h. antikörpervermittelten Immunantwort führt.

HLA-Klasse I und HLA-Klasse II Moleküle unterscheiden sich im Expressionsmuster. HLA-Klasse I Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert, während HLA-Klasse II Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen, Makrophagen, Monozyten, B-Zellen und einigen Endothelzellen exprimiert werden. Durch das ubiquitäre Vorkommen und den hohen Polymorphismus der HLA-Moleküle sind sie von entscheidender Bedeutung für alle Transplantationsformen, einschließlich der Nierentransplantation. Bei der Nierentransplantation müssen oft Diskrepanzen zwischen Organspender und Organempfänger akzeptiert werden. In diesem Fall können die HLA-Antigene des Organspenders im Organempfänger eine Abstoßungsreaktion verursachen, aus der der Verlust der transplantierten Niere resultieren kann.

Das hohe immunogene Potential der HLA-Moleküle basiert auf der Tatsache, dass durch HLA-Moleküle eine Palette von antigenen Determinanten zur Verfügung gestellt werden. Es wird unterschieden zwischen:

- 1.) Polymorphen Bereichen der inkompatiblen HLA-Antigene, deren Konfiguration nicht durch gebundene Peptide beeinflusst ist.
- 2.) Konformationsdeterminanten, die von der Bindung von Peptiden abhängig sind, jedoch das Peptid selbst nicht einbeziehen.
- 3.) Interaktionsdeterminanten, die von HLA-Molekülen und gebundenen Peptiden gemeinsam gebildet werden.

Die Collaborative Transplant Study (CTS), an der über 300 Transplantationseinheiten aus 45 Ländern beteiligt waren, belegt eindeutig den Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Transplantatüberlebensrate (Opelz et al., 1999). Aus diesem Grunde werden bei Transplantationen Spender und Empfänger gematcht, d.h. HLA-typisiert und Individuen mit möglichst wenigen Mismatches ausgewählt. Interessanterweise wurde beobachtet, dass HLA-gematchte Personen Abstoßungsreaktionen zeigten, obwohl sie auf genetischer Ebene in den untersuchten Allelen vollständig übereinstimmten. Hieraus resultiert die Existenz von weiteren Antigenen, die zu Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen führen können. Diese Antigene werden auch als non-HLA-Antigene bezeichnet und stellen schwache Transplantationsantigene dar. Zu ihnen zählen alle genetisch determinierten polymorphen Zellproteine, die nicht zum HLA-Komplex gehören. Nach der Prozessierung können immunogene Peptide der polymorphen Zellproteine im Kontext mit HLA-Klasse I Molekülen präsentiert werden. Unterscheiden sich Nierenempfänger und Nierenspender in den Zellproteinen, so kann trotz HLA-kompatibler Transplantation eine zelluläre Rejektion ausgelöst werden (Wonigeit und Pichlmayr, 1997). Die Wahrscheinlichkeit eines derartigen Ereignisses ist allerdings relativ gering, da der genetische Polymorphismus für die meisten zellulären Proteine schwach ausgeprägt ist. Aus diesem Grund ist die genetische Kompatibilität zwischen Nierenorganspender und Nierenorganempfänger für die meisten zellulär kodierten Proteine oft gegeben. Deshalb lösen non-HLA-Antigene nur mit niedriger Frequenz eine zelluläre Rejektion aus, so dass sie zu den schwachen Antigenen gezählt werden. Ihr Einfluss auf den Transplantationserfolg ist aber nicht zu unterschätzen. Daher werden immer mehr Untersuchungen unternommen, um die Beziehung von non-HLA-Antigenen und Abstoßungsreaktionen zu charakterisieren.

Außer den zellulären Rejektionen können non-HLA-Antigene auch humorale Immunantworten im Nierenempfänger auslösen. Dieser Rejektionstyp tritt bevorzugt bei non-HLA-Antigenen auf, die von Endothelzellen und Monozyten exprimiert werden oder zum Lewis- Blutgruppensystem gehören (Paul et al., 1979; Cerilli et al., 1985; Suberbielle- Boissel et al., 1998a, 1998b). Bei diesen Antigenen handelt es sich um Moleküle, die in der

Zellmembran verankert sind und als native Proteine von entsprechenden Antikörpern erkannt werden und somit eine Abstoßungsreaktion auslösen können. Welche Moleküle und Strukturen hierbei als Epitope wirken ist bisher weitgehend unbekannt.

Zellen besitzen jeweils ein für sie spezifisches Muster an Oberflächenmarkern. Diese so genannten CD-Moleküle können dazu benutzt werden, um einen Zelltyp zu charakterisieren. Die Oberflächenmoleküle CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 werden beispielsweise von Monozyten exprimiert und es ist denkbar, dass sie zur Klasse der non-HLA-Antigene gehören. Durch ihre Strukturmerkmale werden sie verschiedenen Molekülfamilien zugeordnet. CD63 und CD151 zählen zu der Transmembran 4-Superfamilie, die durch 4 transmembrane Regionen charakterisiert ist. Die Moleküle der TM4SF sind bei biologischen Prozessen, wie Signaltransduktion, Zellaktivierung, -proliferation, -motilität und -adhäsion beteiligt (Wright und Tomlinson 1994; Maecker et al., 1997; Hemler et al., 2001). Das Gen für CD63 fungiert zusätzlich als Suppressorgen bei Melanomzellen, CD151 reguliert die Thrombozytenaggregation und inhibiert die durch Integrine vermittelte Zellmigration (Radford et al., 1997). Beide Antigene werden von Monozyten und Thrombozyten, CD63 zusätzlich von Makrophagen, Granulozyten, B- und T-Zellen exprimiert. CD151 kommt außerdem auf Megakaryozyten und Endothelzellen vor (Ashman et al., 1991; Azorosa und Hildreth, 1995; Sincock et al., 1997).

CDw92 dient als Transporter von Cholin für die Membranphospholipidsynthese von Immunzellen und zählt zu den multitransmembranen Oberflächenproteinen. Es wird vermutet, dass diesem Protein eine Funktion bei der spezifischen Regulation von Immunfunktionen zufällt (Wille et al., 2001). CDw92 konnte auf Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten nachgewiesen werden (Majdic et al., 1995).

Bei CD93 handelt es sich um ein Typ I-Oberflächenglykoprotein, welches ebenfalls über transmembrane Regionen verfügt und mit dem Komplementfaktor C1q interagiert (Steinberger et al., 2002). Durch seine Bindung mit dem Plasmaprotein C1q, dem mannosebindenden Lektin (MBL)

oder dem pulmonalen Surfactantprotein (SPA) kann die Phagozytoseaktivität von Monozyten gesteigert werden (Tenner et al., 1989, 1995; Guan et al., 1991). CD93 wird von Monozyten, Granulozyten und Endothelzellen exprimiert (Mai et al., 1995).

CD102 zählt neben 4 weiteren Molekülen zur Gruppe der interzellulären Adhäsionsmoleküle und wird daher auch als ICAM-2 bezeichnet. Strukturell sind diese Adhäsionsmoleküle Immunglobuline und unterstützen in einem unterschiedlichen Ausmaß die Adhäsion von Immunzellen an das Gefäßendothel. Wie die anderen Mitglieder fungiert auch CD102 als Ligand für das LFA-1 (Staunton et al., 1989). Darüber hinaus beeinflusst ICAM-2 die durch den MHC-II-Komplex gesteuerte Stimulation von CD4+ T-Zellen und verstärkt die Mobilität und Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen (Damle et al., 1992; Somersalo et al., 1995; Carpenito et al., 1997). CD102 kommt auf Monozyten, Granulozyten und Endothelzellen vor (de Fougerolles et al., 1991).

2.2.2 Abstoßungsreaktionen und Abstoßungsimmunologie

Abstoßungsreaktionen können nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens in hyperakute, akute und chronische Rejektionen eingeteilt werden. Um die histologischen Veränderungen und Schweregrade der Abstoßungsreaktionen zu klassifizieren, hat sich die Banff-Klassifikation etabliert, die in der täglichen Diagnostik angewandt wird (Solez et al., 1993). Klinisch werden alle Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation durch eine Funktionsverschlechterung des Transplantates mit Anstieg der Retentionswerte Kreatinin und Harnstoff und erhöhten Entzündungswerten auffällig. Es kommt zur Abnahme der Urinmenge, Gewichtszunahme, Inappetenz und Druckschmerzhaftigkeit des Transplantates.

Je nach Abstoßungstyp treten zelluläre und humorale Mechanismen auf, wobei neben HLA-Klasse I/II Komplexen auch non-HLA-Moleküle in den Abstoßungsprozess involviert sind. Vorwiegend sind zytotoxische T-Zellen, Antikörper und Komplement von entscheidender Bedeutung. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Antikörperbildung mit einer verkürzten Überlebenszeit des Transplantates einhergeht (Mc Kenna et al.,

2000). Grund dafür ist das vermehrte Auftreten von akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen. Bei allen Rejektionstypen werden neben den bekannten HLA-Antikörpern auch non-HLA-Ak als mögliche Ursache, vor allem nach HLA-identischer Transplantation, diskutiert.

Es ist bekannt, dass präformierte Antikörper, welche infolge vorangegangener Bluttransfusionen, Transplantationen oder Schwangerschaften gebildet wurden, die Ursache für hyperakute Abstoßungsreaktionen darstellen und sich gegen HLA-Antigene und non-HLA-Antigene richten (Rodriguez et al., 2000). Im Körper des Empfängers können somit bereits Alloantikörper gegen Blutgruppenantigene, polymorphe HLA-Antigene und non-HLA-Antigene vorhanden sein. Diese präformierten Antikörper binden an die Endothelzellen der Transplantatgefäße und aktivieren darüber das Komplementsystem. Innerhalb weniger Sekunden bis Stunden kommt es zu einer Gewebeschädigung mit Aktivierung des Gerinnungssystems, intravasaler Blutgerinnung und Zerstörung des Transplantates (Auchincloss und Sachs, 1993; Janeway und Travers, 1997). Bei der akuten vaskulären Abstoßung binden ebenfalls Antikörper an endotheliale Alloantigene und führen zur Aktivierung des Komplementsystems mit anschließender Zerstörung von Endothelzellen (van der Woud und Hollander, 1998). Von non-HLA-Ak ist bekannt, dass sie die Fähigkeit haben Endothelzellen nach Komplementaktivierung oder über den ADCC Mechanismus zu lysieren (Miltenburg et al., 1989; Al-Hussein et al., 1995). Durch die Bindung von non-HLA-Ak können Endothelzellen von einem antikoagulatorischen in einen prokoagulatorischen Zustand transformiert werden (Platt, 1995).

Die chronische Abstoßung tritt Monate bis Jahre nach Nierentransplantation auf und führt zu den meisten Organverlusten. Die genaue Pathogenese ist noch nicht vollständig geklärt. Es werden zelluläre und humorale Komponenten diskutiert. Wilhelm und Mitarbeiter beschreiben die chronische Abstoßung entsprechend einem experimentellen Model in drei Phasen, wobei vor allem in der ersten Phase Antikörper des Empfängers mit Antigenen des Transplantates interagieren (Wilhelm et al., 1998). Nach neueren Kenntnissen sind auch non-HLA-Ak in chronische Nierentransplantatabstoßungen verwickelt (Joosten et al., 2005).

Genaue Erkenntnisse über Einfluss und Wirkmechanismus von non-HLA-Ak bei Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation können jedoch erst erzielt werden, wenn Antigene und Zielstrukturen der non-HLA-Ak identifiziert wurden. Besonders gegen monozytäre und endotheliale Antigene gerichtete non-HLA-Ak sind bekannt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden jedoch weder die Antigene noch die Epitope für die monozytären Antikörper genau definiert.

3 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob in Seren von nierentransplantierten Patienten non-HLA-Ak vorhanden sind, die gegen ausgewählte Epitope auf von Monozyten exprimierten Antigenen gerichtet sind.

Die Untersuchungen wurden unter folgenden Fragestellungen durchgeführt:

1. Lassen sich in den zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommenen Seren nierentransplantierter Patienten non-HLA-Ak nachweisen, die mit definierten Epitopen auf den monozytär exprimierten Adhäsionsmolekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 reagieren?
2. Sind bereits präoperativ non-HLA-Ak gegen monozytäre Antigenen nachweisbar oder bilden sich diese erst nach Transplantation?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von monozytären non-HLA-Ak und einer verzögerten Funktionsaufnahme bzw. einer akuten Abstoßungsreaktion des Nierentransplantates?
4. Ist die Methode der Durchflußzytometrie zum Nachweis von monozytären non-HLA-Ak geeignet?

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Lösungen für FACS- Färbungen

Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
CaliBRITE- Beads, Dreifarbenset	BD, San Jose, CA, USA
FACS- Flow	BD, San Jose, CA, USA
FACS- Lysing Solution, 10fach konzentriert	BD, San Jose, CA, USA
FACS- Rinse	BD, San Jose, CA, USA
FACS- Safe	BD, San Jose, CA, USA
PBS, 10mM, pH 7,4	Sigma, Steinheim
Streptavidin-Phycoerythrin-Conjugate	BD, San Jose, CA, USA

Für die Untersuchungen mussten einfach konzentrierte Lyselösung und PBS wie folgt hergestellt werden:

- Herstellung einer einfach konzentrierten Lyselösung: Hierzu wurden 100 ml 10fach konzentrierter FACS-Lysing Solution in einem 1000 ml Messkolben mit 900 ml Aqua dest. aufgefüllt und anschließend gemischt. Die Lagerung der angefertigten Lösung erfolgte bei Raumtemperatur.
- Herstellung von PBS: Die Salze für die phosphatgepufferte Salzlösung waren in einer Tablette konzentriert. Eine Tablette wurde in 1000 ml Aqua dest. aufgelöst, woraus eine 10 mM Lösung mit einem pH-Wert von 7,4 resultierte. Die Lagerung der Lösung erfolgte im Kühlschrank.

Nach Ablauf der vom Hersteller angegebenen Haltbarkeitsdauer wurden beide Lösungen neu hergestellt.

4.1.2 Monoklonale Antikörper

In der Arbeit wurden konjugierte monoklonale Antikörper aus der Maus vom Typ IgG1, IgG2a und IgG2b verwendet. Alle benutzten monoklonalen Antikörper sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Liste der verwendeten monoklonalen Antikörper

mAk/Klon	Spezifität/Rezeptor	Fluorochrom	Hersteller
M5E2	CD14/ LPS	FITC	BD, San Jose, CA, USA
M5E2	CD14/ LPS	PE	BD, San Jose, CA, USA
H5C6	CD63/ MLA-1, LAMP-3	PE	BD, San Jose, CA, USA
H5C6	CD63/ MLA-1, LAMP-3	unkonjugiert	BD, San Jose, CA, USA
VIM15	CDw92/ CTL1	FITC	BD, San Jose, CA, USA
VIM15	CDw92/ CTL1	unkonjugiert	BD, San Jose, CA, USA
X-2	CD93/ C1q	Biotin, in Kombination mit Streptavidin-PE	Dianova, Hamburg, Deutschland
X-2	CD93/ C1q	unkonjugiert	Dianova, Hamburg, Deutschland
B-T1	CD102/ LFA-1	FITC	Linaris
B-T1	CD102/ LFA-1	unkonjugiert	Linaris
14A2H1	CD151/ PETA3, SFA1	PE	BD, San Jose, CA, USA
14A2H1	CD151/ PETA3, SFA1	unkonjugiert	BD, San Jose, CA, USA

M5E2 wurde angewendet um die Monozytenpopulation zu definieren. Die mit FITC- oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörper dienten der Zellmarkierung, die unkonjugierten monoklonalen Antikörper wurden für Blockierungsexperimente eingesetzt.

4.1.3 Seren

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 111 Seren von 37 nierentransplantierten Patienten untersucht. Die untersuchten Seren wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach Nierentransplantation an der Universitätsklinik Rostock im Zeitraum von 1996 bis 1998 gewonnen. Nach NTX kam es zu unterschiedlichen postoperativen Verläufen, so dass die Einteilung in 3 Kollektive erfolgte.

Kollektiv 1 stellte die Gruppe der Patienten mit akuter Rejektion, Kollektiv 2 die Gruppe der Patienten mit verzögerter Funktionsaufnahme und Kollektiv 3 die Gruppe der Patienten mit sofortiger Funktionsaufnahme des Transplantates nach NTX dar.

Die Serumproben wurden 1-2 Tage vor Transplantation, innerhalb 7 Tage und 2-3 Wochen nach Transplantation gewonnen. Lag keine Serumprobe aus diesem Zeitraum vor, so wurde eine Probe aus der ersten oder dritten Woche nach Transplantation untersucht. Bei Patienten aus Kollektiv 1 wurde zusätzlich eine dritte Serumprobe in die Untersuchungen eingeschlossen, wenn die akute Rejektion nicht im Zeitraum von 7 bis 14 Tage nach der NTX histologisch feststellbar war. In diesem Falle wurde die Probe dann entnommen, wenn der histologische Nachweis einer akuten Rejektion vorlag. Die Seren wurden bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

4.1.4 Monozytenspender

Für die Auswahl eines geeigneten Monozytenpenders wurden Vollblutproben von mehreren gesunden anonymisierten Blutspendern/-inen gewonnen. Die Monozyten eines/ einer Spenders/-in waren für die durchflußzytometrischen Messungen besonders gut geeignet, so dass sämtliche durchflußzytometrische Untersuchungen mit diesen Monozyten durchgeführt wurden.

4.1.5 Verbrauchsmaterialien

EDTA-Monovetten	3 ml	Sarstedt
EDTA-Monovetten	9 ml	Sarstedt
Monovetten-Kanüle	Gr.2	Sarstedt
Pipettenspitzen	10-100 µl	Greiner
Pipettenspitzen	100-1000 µl	Greiner
Polypropylen- Proberöhrchen	5ml	BD
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

4.1.6 Geräte

Durchflußzytometer: FACS-Calibur		BD
Laserdrucker: Phraser 740L		Tektronix
Macintosh-Computer		Apple Computer GmbH
Pipetten	0-1000 µl	Gilson, Frankreich
Vortexer: Reax control		Heidolph, Deutschland
Zentrifuge: Biofuge pico		Heraeus, Hanau
Zentrifuge: 13		Heraeus, Hanau

4.2. Grundlagen und Aufbau des Durchflußzytometers

Mit der Durchflußzytometrie können Zelleigenschaften, wie Zellgröße und intrazelluläre Strukturen, sowie exprimierte Moleküle auf der Zelloberfläche von einzelnen Zellen analysiert werden. Dabei werden die Antigene mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen. Durch die morphologischen Merkmale der Zelle werden die Vorwärts- und Seitenstreulichtparameter festgelegt. Dadurch können die Blutzellen in Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten differenziert werden. Zusätzlich wird durch die eingesetzten Antikörper das Antigenmuster einer Zelle spezifiziert.

Das hier verwendete FACS-Calibur setzt sich aus den Komponenten Flüssigkeitssystem, Optisches System und Signalverarbeitung zusammen. Das Messprinzip beruht auf der hydrodynamischen Fokussierung, wodurch

die fluoreszenzmarkierten Zellen wie an einer Perlenkette und somit als Einzelzelle separat an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet werden.

Das mittels eines Argonlaserstrahls generierte monochromatische Licht hat eine Wellenlänge von 488 nm. Je nach Art der Zelle wird das auftreffende monochromatische Licht entsprechend Größe, Struktur der Zellmembran und Art der intrazellulären Bestandteile in spezifischer Weise gestreut. Dabei gibt das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter), gemessen entlang der Achse des einfallenden Lichtes, Auskunft über die relative Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter) hingegen wird in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen und bestimmt somit die Granularität bzw. die interne Struktur und Komplexität einer Zelle.

Ein exprimiertes Antigen einer Zelle kann nachgewiesen werden, wenn die Zelle mit einem fluoreszenzmarkierten mAk inkubiert wird, der gegen das entsprechende Antigen gerichtet ist. In der vorliegenden Arbeit waren die mAk mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoresceinisothiocyanat und Phycoerythrin gekoppelt. Durch das vom Laser generierte Licht werden die Farbstoffe angeregt und emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Für FITC liegt das Maximum bei 515 nm und für PE bei 580 nm, wodurch die Emissionsmaxima für die beiden Fluoreszenzfarbstoffe getrennt werden können. Das optische Signal wird über Spiegel gebündelt und gefiltert, um danach durch Detektoren (Photomultiplier) in elektrische Impulse konvertiert zu werden (Abb.2). Die quantitative Datenauswertung leistet der angeschlossene Computer mit dem CellQuest Programm von Becton Dickinson (Raffael et al., 1994).

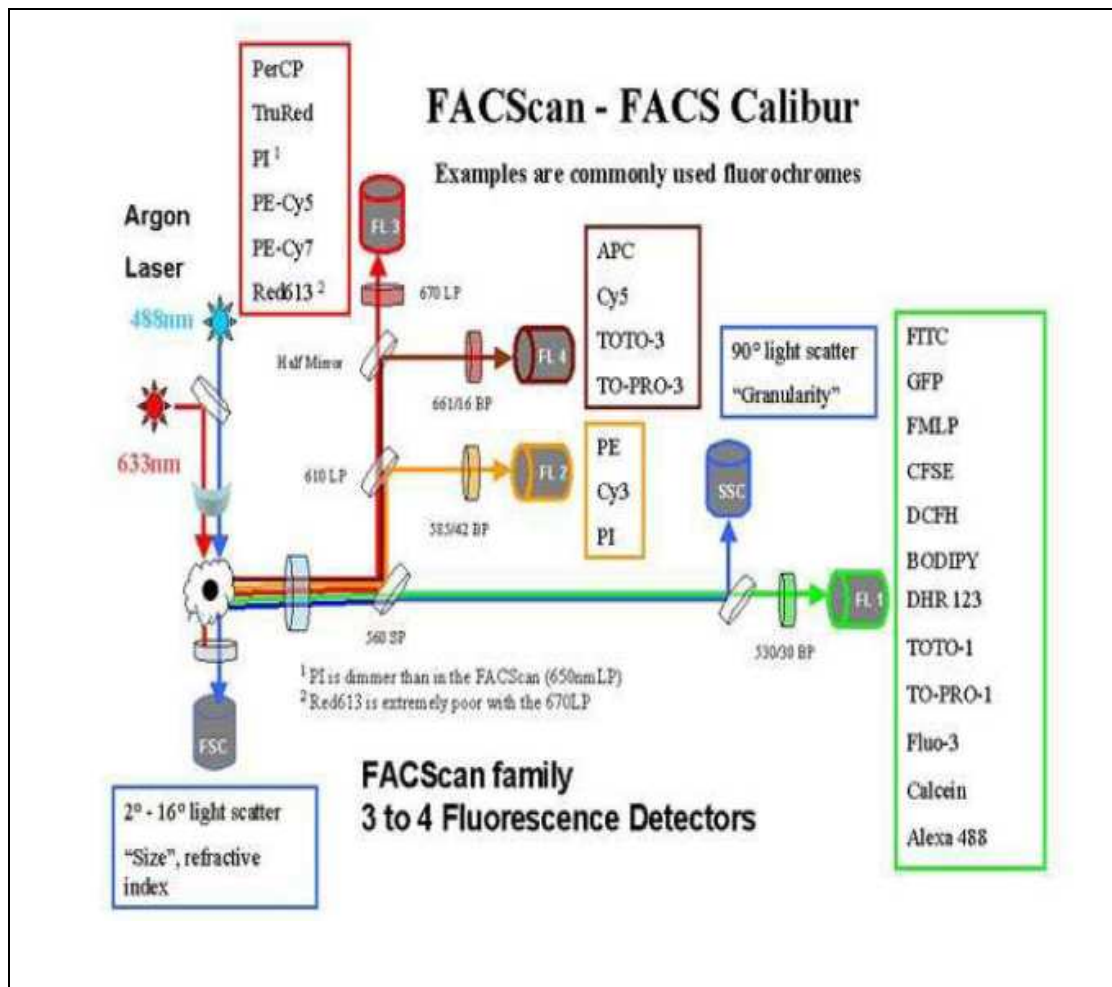


Abbildung 2: Darstellung des optischen Systems und Detektion der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe im FACS der Firma Becton Dickinson. Es sind die Kanäle und die einzelnen Farbstoffe aufgeführt. ® BD, San Jose CA., USA

4.3 Durchflußzytometrische Messungen

4.3.1 Voreinstellungen des Durchflußzytometers

Bevor mit den Messungen am Durchflußzytometer begonnen werden konnte, mussten die Geräteeinstellungen (= Instrument Settings) festgelegt werden. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass die Zellgruppen gut voneinander abgrenzbar waren und unerwünschte Messsignale nicht dargestellt wurden (Tab.2). Durch die Einstellung des FSC- und SSC- Schwellenwertes auf 108 bzw. 152 wurden störende Signale wie Zelltrümmer von den Messungen ausgeschlossen.

Die Fluoreszenzeinstellungen des Gerätes wurden regelmäßig mit „Calibrite-Beads“ und dem Softwareprogramm „FACSCComp“ von Becton Dickinson durchgeführt.

Tabelle 2: Einstellungsparameter der Verstärker am Durchflußzytometer für die Darstellung der Monozytenpopulation

Parameter	Detector	Voltage	Amp.Gain	Mode
P1	FSC	E00	1,16	Lin
P2	SSC	350	1,32	Lin
P3	FL1	562		Log
P4	FL2	571		Log

Detector = Verstärker, FSC = Vorwärtsstreulicht; SSC = Seitwärtsstreulicht; FL 1 = Fluoreszenz 1, FL 2 = Fluoreszenz 2, Voltage = Spannung, E00 = Messwerte werden nicht verstärkt; Amp.Gain = Verstärker, Lin = Verstärkung kann zwischen 1 bis 9,99 festgelegt werden, Log = standardmäßig vier Log- Dekaden, zur Unterscheidung zwischen negativ und schwach „positiven“ Signalen

4.3.2 Fluoreszenzfärbung der Zellen

Die Färbung der Zellen für die durchflußzytometrischen Messungen erfolgte direkt mit fluoreszenzgekoppelten mAk. Die Konzentration der mAk musste dabei so gewählt werden, dass sämtliche Antigene auf Monozyten abgesättigt wurden und möglichst wenige unspezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen auftraten. Um die optimale Färbekonzentration zu erhalten wurde jeder verwendete mAk austitriert.

Hierbei wurden einer Probe unterschiedliche Verdünnungsstufen der mAk zugesetzt und am Durchflußzytometer die mittlere Fluoreszenzintensität gemessen. In Abbildung 3 ist am Beispiel des mAk X-2, der gegen das Antigen CD93 gerichtet ist, die Titrationskurve für diesen mAk dargestellt. Ab einer Verdünnungsstufe von 1:2 liegt der mAk im Sättigungsbereich vor, da die Fluoreszenzintensität für den unverdünnten mAk und den 1:2 verdünnten mAk unverändert bleibt. Im Vergleich dazu nimmt sie bei der Verdünnung 1:4 ab, so dass der mAk hier nicht mehr sämtliche Antigene absättigen kann. Aus diesem Grund ist für den mAk X-2 die 1:2 Verdünnungsstufe die

Optimalkonzentration, da bei dieser Verdünnungsstufe sämtliche CD93Antigene mit dem mAk X-2 bedeckt sind. Für jeden verwendeten mAk wurde mit diesem Verfahren die optimale Konzentration bestimmt, bei denen am ökonomischsten die Sättigungskonzentration erreicht wurde. Die Optimalkonzentrationen für die FITC-markierten mAk M5E2, VIM 15, B-T1 und für die PE-markierten mAk M5E2, H5C6 und 14A2H1 sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

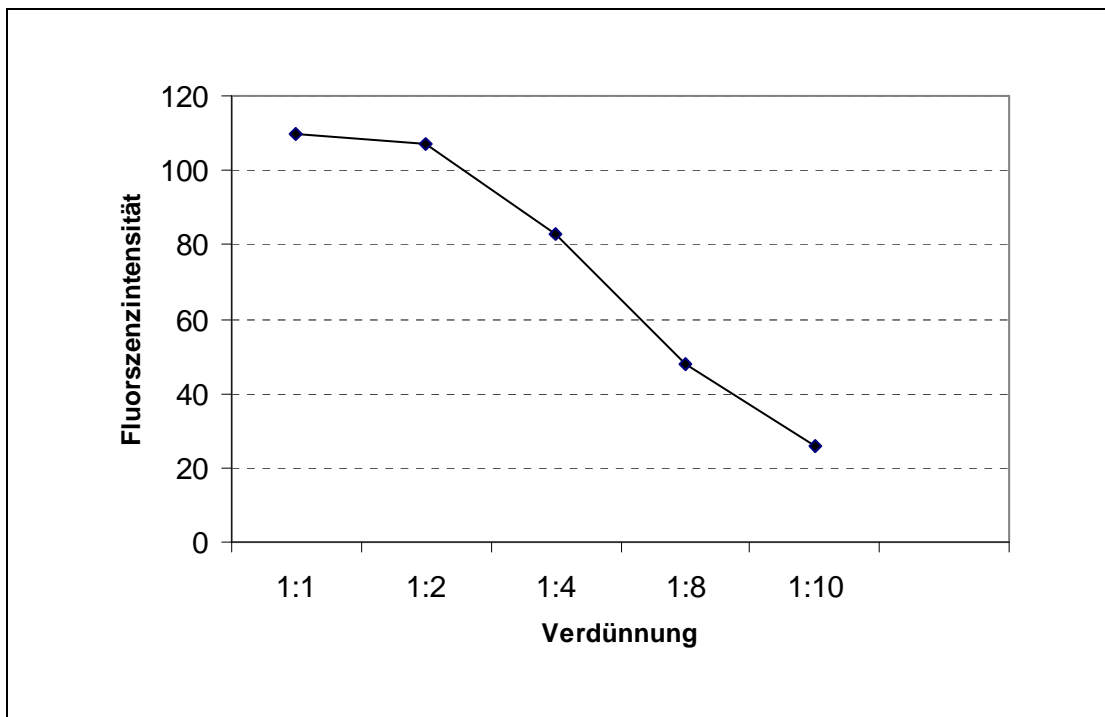


Abbildung 3: Titrationskurve des mAk X-2 gegen das Antigen CD93. CD14/ SSC identifizierte Monozyten wurden jeweils mit 5 µl des mAk X-2 in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (X- Achse) in Kombination mit 5 µl PE-Streptavidin angefärbt und die Fluoreszenzintensität (Y- Achse) im Durchflußzytometer bestimmt.

Tabelle 3: Verwendete Verdünnungen der fluoreszenzmarkierten mAk

mAk/Klon	Fluoreszenzmarkierung	Anfärbekonzentration
M5E2	FITC	5 µl einer 1:8 Verdünnung
M5E2	PE	5 µl einer 1:20 Verdünnung
H5C6	PE	5 µl einer 1:10 Verdünnung
VIM15	FITC	5 µl einer 1:8 Verdünnung
X-2	biotinyliert in Kombination mit PE-Streptavidin	5 µl einer 1:2 Verdünnung
B-T1	FITC	5µl unverdünnt
14A2H1	PE	5µl unverdünnt

4.3.3 Ansatz für die Festlegung der Ausgangsfluoreszenz

35 µl einer EDTA-Vollblutprobe wurden mit jeweils 5 µl FITC- oder PE-markiertem monoklonalen Ak M5E2, 5 µl unterschiedlich konzentrierten FITC- oder PE-markierten monoklonalen Ak (H5C6, VIM 15, X-2, B-T1 oder 14A2H1) und 5 µl PBS gemischt.

Im einzelnen wurden folgende Antikörperkombinationen gewählt:

- H5C6 PE-markiert + M5E2 FITC-markiert
- VIM 15 FITC-markiert + M5E2 PE-markiert
- X-2 biotinyliert + Streptavidin- Phycoerythrin + M5E2 FITC-markiert
- B-T1 FITC-markiert + M5E2 PE-markiert
- 14A2H1 PE-markiert + M5E2 FITC-markiert

Die Ansätze wurden anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit 1,2 ml einer 1:10 verdünnten FACS-Lyse-Lösung gemischt und 10 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurden die Ansätze 5 Minuten bei 2000xg und RT zentrifugiert, ca. 100 µl des Überstandes im Eppendorfgefäß belassen und der Rest des Überstandes verworfen. Nun wurde das Zellsediment durch die Zugabe von 1 ml PBS suspendiert und danach bei 2000xg und RT für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Waschschrift wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 250 µl PBS resuspendiert und in die für die durchflußzytometrische Analyse geeigneten Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Doppelfluoreszenzmessung der Proben am FACS-Calibur. Hierbei wurden

jeweils für jede Zelle die Fluoreszenzintensität des gegen CD63, CDw92, CD93, CD102 oder CD151 gerichteten mAk und die Fluoreszenzintensität des gegen CD14 gerichteten mAk gleichzeitig erfasst. Als Filterkombination waren 520 nm (FITC) und 572 nm (PE) eingestellt. Pro Ansatz wurden zunächst 15000 Ereignisse (Events) gemessen. Bei der Datenauswertung wurden durch das Setzen eines Analysefensters („Gate“) nur die Monozyten berücksichtigt.

4.3.4 Ansatz zur Bestimmung von non-HLA-Ak in Seren von nierentransplantierten Patienten

35 µl einer EDTA- Vollblutprobe wurden mit jeweils 5 µl FITC- oder PE-markiertem monoklonalen Ak M5E2, 5 µl unterschiedlich konzentrierter FITC- oder PE-markierter monoklonaler Ak (H5C6, VIM 15, X-2, B-T1 und 14A2H1) und 5 µl Patientenserum, welches zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen wurde, gemischt.

Es wurden die gleichen Antikörperkombinationen wie unter Punkt 4.3.3 verwendet. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden wie unter Punkt 4.3.3 durchgeführt.

4.3.5 Ansatz für die Positivkontrolle

35 µl einer EDTA-Vollblutprobe wurden mit jeweils 5 µl FITC- oder PE-markiertem monoklonalen Ak M5E2, 5 µl unterschiedlich konzentrierter FITC- oder PE-markierter monoklonaler Ak (H5C6, VIM 15, X-2, B-T1 und 14A2H1) und 5 µl unmarkierter mAk (H5C6, VIM 15, X-2, B-T1 und 14A2H1) gemischt. Es wurden die gleichen Antikörperkombinationen wie unter Punkt 4.3.3 verwendet. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden wie unter Punkt 4.3.3 durchgeführt.

4.3.6 Ansatz ohne fluoreszenzmarkierten mAk (Leeransatz)

35 µl einer EDTA-Vollblutprobe wurden mit 15 µl PBS gemischt. Bei diesem Ansatz erfolgte keine Zugabe von fluoreszenzmarkierten mAk. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden wie unter Punkt 4.3.3 durchgeführt.

4.4 Darstellungen am Durchflußzytometer und Auswertung der Daten

Zur Erfassung und Auswertung der ermittelten Daten wurde die CellQuest-Software des angeschlossenen Computers genutzt.

Zur Darstellung der Messergebnisse standen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden die Histogramm- und Zweipunktparameterdarstellung (Dot Plot) angewendet. Durch die Histogrammdarstellung wird die Häufigkeitsverteilung eines Parameters wiedergegeben. Im Dot Plot werden hingegen zwei Parameter zueinander in Beziehung gesetzt. In Abbildung 4 ist ein Punktediagramm einer Vollblutprobe mit den Einstellungen aus Punkt 4.3.1 dargestellt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Vorwärts- und Seitenstreulichteigenschaften können die Lymphozyten-, Monozyten- und Granulozytenpopulationen gut voneinander abgegrenzt werden.

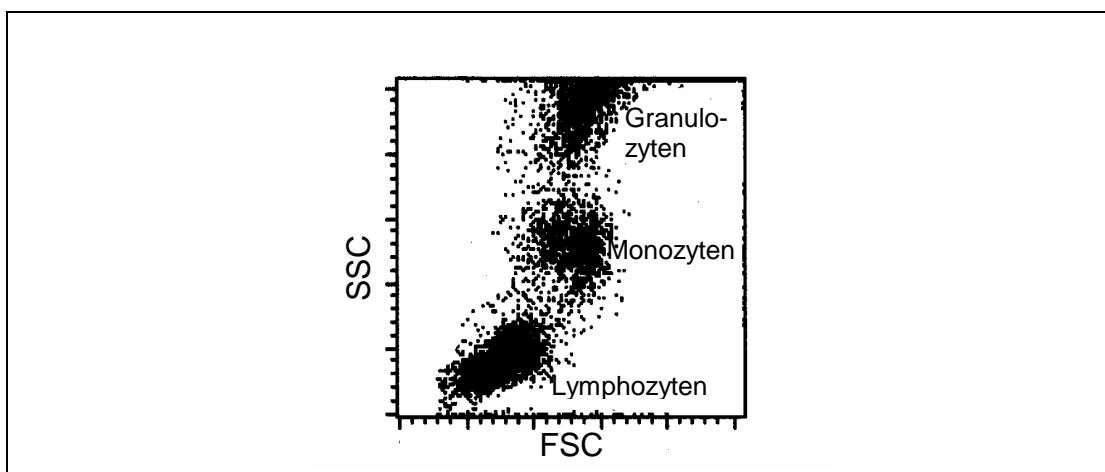


Abbildung 4: Dot Plot. In dieser Abbildung sind humane Leukozyten zu sehen, die für durchflußzytometrische Bestimmungen aus einer Vollblutprobe gewonnen wurden. Wegen ihren unterschiedlichen Eigenschaften konnten sie durch das Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) als Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten charakterisiert werden.

Da die Auswertungen nur für Monozyten durchgeführt wurden, mussten die Eigenschaften der Monozyten selektiv erfasst werden. Dies wurde durch das Setzen eines Analysefensters (Gate) erreicht (Abb.5). Derartige Analysefenster wurden verwendet, um die Negativkontrolle für die Monozytenpopulation festzulegen, mit der die Monozyten ohne vorherige Antikörperinkubation gemessen wurden.

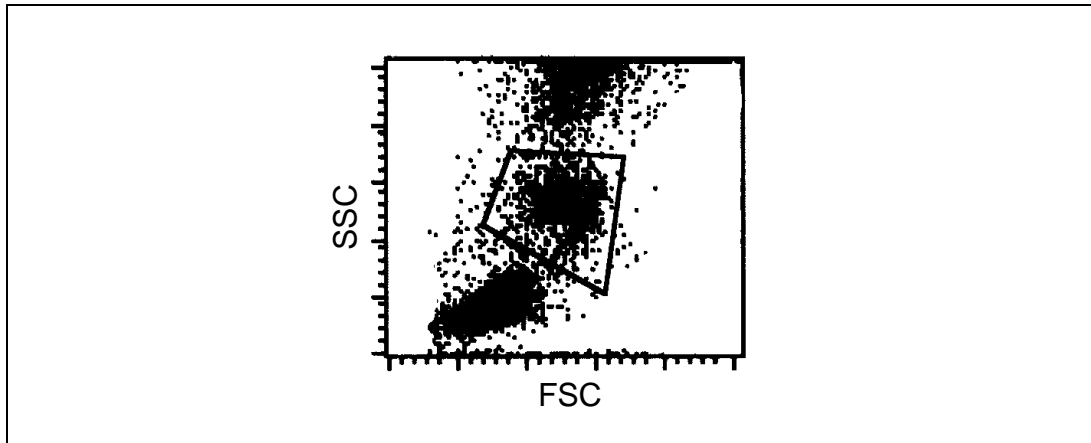


Abbildung 5: Setzen eines Analysefensters (Gate). Durch das Setzen eines Gates, welches in der Abbildung als Viereck dargestellt ist, wurde nur die Monozytenpopulation betrachtet.

Die Monozytenpopulation kann zusätzlich durch das ausschließliche von Monozyten exprimierte CD14 Antigen identifiziert werden. Durch die Darstellung der CD14 Expression in Kombination mit dem Seitwärtsstreulicht in einem Dot Plot lässt sich die Monozytenpopulation eindeutig als separate Population darstellen. Um diese Population kann ebenfalls leicht ein Analysefenster gelegt und somit ausschließlich Monozyten analysiert werden (Abb.6). In der Arbeit wurde dieses Verfahren angewendet, da es für die Identifizierung einer Monozytenpopulation sehr gut geeignet ist, wenn das CD14 Antigen in Kombination mit einem anderen Antigen in einer Doppelfluoreszenzanalyse analysiert werden soll.

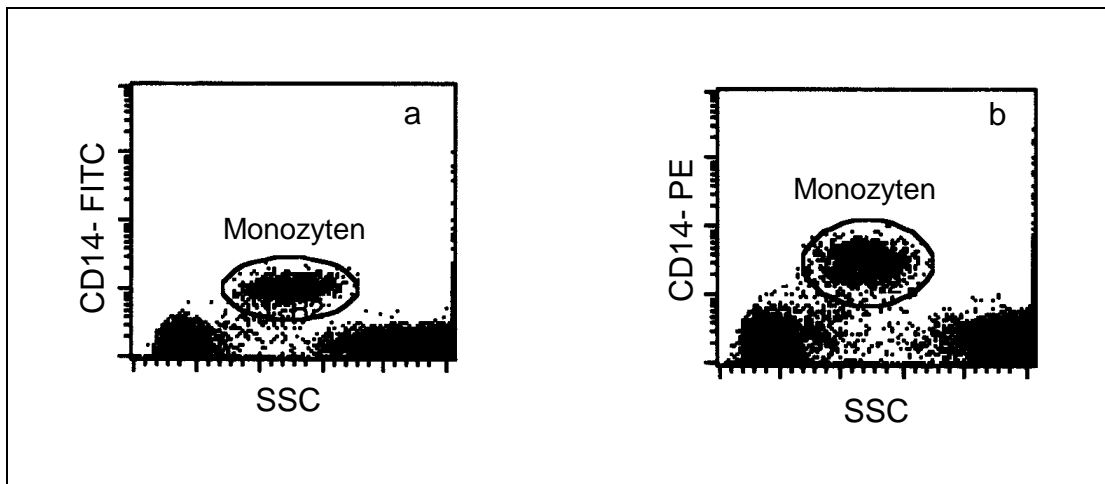


Abbildung 6: Dot Plot Darstellung der CD14 FITC- bzw. PE-markierten Monozyten in Kombination mit dem SSC. Im Dot Plot a wurden die Monozyten mit dem FITC-markierten monoklonalen Antikörpers M5E2 und im Dot Plot b mit dem PE-markierten monoklonalen Antikörper M5E2 angefärbt. Das Analysefenster ist als Kreis dargestellt und die Monozytenpopulation ist beschriftet.

Nachdem um die Monozytenpopulation ein Gate gelegt wurde, erfolgte anschließend die Darstellung im Histogramm und somit die Darstellung der gemessenen Fluoreszenzintensität. Für das Histogramm wurde anschließend eine Histogrammstatistik angezeigt. Aus dieser Histogrammstatistik wurde zur Auswertung die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean-Wert) ausgewählt. Die erhaltenen Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität der Patientengruppen wurden in Excel-Tabellen eingegeben. Mit einer deskriptiven Statistik wurden der statistische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

5 Ergebnisse

5.1 Patienten

Alle 37 Patienten wurden im Zeitraum von 1996-1998 am Nierentransplantationszentrum Rostock einer Nierentransplantation unterzogen. Dabei führten unterschiedliche Grunderkrankungen der Patienten zur terminalen Niereninsuffizienz, welche letztlich die NTX notwendig machten. In Tabelle 4 sind diese Grunderkrankungen für alle drei Kollektive zusammengefasst. Tabelle 5 zeigt die Geschlechterverteilung im jeweiligen Kollektiv.

Tabelle 4: Auflistung der zur terminalen Niereninsuffizienz führenden Grunderkrankungen der Patienten aller drei Kollektive

Grunderkrankung	Kollektiv 1	Kollektiv 2	Kollektiv 3
chronische Glomerulonephritis	7	5	4
chronische Pyelonephritis	0	2	1
Zystennieren	2	1	3
Neophrosklerose bei Hypertonie	1	0	0
toxische Ursachen	1	0	0
unbekannt	0	0	3

Tabelle 5: Geschlecht und Alter der Patienten

	Kollektiv 1	Kollektiv 2	Kollektiv 3
Gesamtzahl	12	10	15
weiblich	3	2	7
männlich	9	8	8
Durchschnittsalter und Spannbreite des Alters bei Transplantation	44 (19-56)	51 (25-66)	43(23-58)

Alle Patienten wurden vor der Transplantation durch Transfusionen, Schwangerschaften oder vorherige Transplantationen möglicherweise sensibilisiert. Um mögliche Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation zu vermeiden, werden routinemäßig alle Transplantatempfänger einem HLA-Ak-Screening unterzogen. Zusätzlich werden Empfänger und Spender HLA-typisiert, um eine möglichst gute Übereinstimmung in den HLA-Antigenen zu gewährleisten.

Die Standardtechnik und das wichtigsten serologische Verfahren zum Nachweis von Ak gegen HLA-Antigene ist der LCT, welcher heute routinemäßig bei allen Nierentransplantatempfängern durchgeführt wird. Beim LCT werden Patientenserum mit Lymphozytenpanels von ausgewählten Blutspendern mit bekanntem HLA-Typ inkubiert. Sind beim Patienten Ak gegen bekannte Antigene auf den Spenderlymphozyten vorhanden, so bildet sich ein Ag-Ak-Komplex, an welchem sich Komplement anlagern kann und somit Lymphozyten lysiert werden. Durch Fluoreszenzmarkierung werden schließlich die zerstörten von den intakten Lymphozyten unterschieden und der prozentuale Anteil der lysierten Zellen bewertet. Dabei wird der Anteil positiver Reaktionen an der Gesamtzahl der Lymphozytenpanels als Panelreaktivität bezeichnet und in Prozent angegeben. Bei 36 Patienten zeigten sich unmittelbar vor NTX im LCT eine Panelreaktivität von 0%, bei einem Patienten von 5%. Somit konnten in den Seren mittels LCT keine HLA-Ak nachgewiesen werden.

Bei negativer LCT-Testung erfolgte zusätzlich die Durchführung eines ELISA's zum Nachweis von HLA-Ak. Die Ergebnisse der ELISA-Testung der Patienten waren leider nicht mehr reproduzierbar, so dass an dieser Stelle keine sichere Aussage zur Existenz von HLA-Ak bei den getesteten 37 Patienten getroffen werden kann.

Ein weiterer Aspekt für die Transplantation ist die Übereinstimmung der HLA-Antigene zwischen Transplantat und Empfänger. Als Matchgrad wird hierbei die Anzahl der nicht übereinstimmenden Antigene als so genanntes Mismatch (MM) angegeben. Für die NTX ist vor allem eine Übereinstimmung der Hauptantigene HLA-A, -B und -DR entscheidend. Zusätzlich wird bei diesen Antigenen eine möglichst gute Übereinstimmung

ihrer Untergruppen, der so genannten Splits gefordert, da unterschiedliche Splits derselben Hauptgruppe als inkompatibel gewertet werden. Eine Übereinstimmung der Antigene auch auf Split-Ebene spricht für ein gutes Match und die somit erhöhte Histokompatibilität für eine bessere Verträglichkeit der transplantierten Niere.

Die erwähnten Untersuchungen wurden für alle 37 Patienten im HLA-Labor des Nierentransplantationszentrum Rostock durchgeführt. Die Ergebnisse der HLA-Typisierung des Empfängers wurden bei Eurotransplant registriert. Bei Vorliegen einer Transplantatniere wurde über das erwähnte Matchverfahren der kompatibelste Empfänger ausgewählt. Von den 37 nierentransplantierten Patienten zeigten vor Transplantation im HLA-Match insgesamt 2 Patienten keinen MM, 2 Patienten 1 MM, 7 Patienten 2 MM, 16 Patienten 3 MM, 6 Patienten 4 MM, 2 Patienten 5 MM und 1 Patient 6 MM. Für 1 Patienten war die HLA-Typisierung des Spenders bei Eurotransplant nicht registriert.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse des LCT, der HLA-Typisierung des Empfängers und Spenders sowie die Matchgrade zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 6: LCT, HLA-Typisierung bei Empfänger und Spender sowie Matchgrad aller 37 Patienten

Nr.	Pat.	Koll.	LCT	HLA- Typisierung Empfänger	HLA- Typisierung Spender	Match-grad
1	T.M.	I	0%	HLA A2, A3,B27,DR15, DR11(5), DR52, DQ6(1),DQ7(3)	HLA A2, A32(19), B27, B51(5), Bw4, Cw2, DR4, DR16(2), DR51, DR52, DQ5(1), DQ8(3)	1,1,2
2	K.A.	I	0%	HLA A1, B8, Bw6, Cw7, DR17(3), DR52, DQ2	HLA A1, A31(19), B51(5), B8, Bw4, Bw6, Cw5, Cw7, DR1, DR17(3), DR52, DQ5(1), DQ2	1,1,1
3	B.W.	I	0%	HLA A2, A24(9), B13, B61(40), Bw4, Bw6, Cw2, Cw6, DR16(2), DR7, DR51, DR53, DQ5(1), DQ2	HLA A1, A10, B8, B13, DR3, DR7	2,1,1
4	T.E.	I	0%	HLA A3, A24(9), B13, B18, Bw4, Bw6, Cw5, Cw6, DR17(3), DR7, DR52, DR53, DQ2	HLA A2, A29(19), B44(12),B60(40), Bw4, Bw6, Cw3, DR1, DR7, DR53, DQ1, DQ2	2,2,1
5	P.P.	I	0%	HLA A3, A32(19), B52(5), B38(16), Bw4, DR11(5), DR7, DR52, DR53, DQ3	nicht registriert	
6	R.D.	I	0%	HLA A2, A3, B13, B35, Bw4, Bw6, Cw4, Cw6, DR7, DR53, DQ2	HLA A2, A3, B18, B35, Bw6, Cw4, Cw7, DR16(2), DR11(5), DR53, DQ5(1), DQ7(3)	0,1,2
7	H.J	I	0%	HLA A1, A2, B57(17), B18, Bw4, Bw6, Cw5, Cw6, DR17(3), DR7, DQ2, DQ9(3)	HLA A24(9), A31(19), B57(17), B18, Bw4, Bw6, Cw5, Cw6, DR3, DR7, DR52, DR53, DQ2, DQ3	2,0,1

8	B.R.	I	0%	HLA A30(19), A32(19), B13, B61(40), Bw4, Bw6, Cw2, Cw6, DR13(6), DR7, DR52, DR53, DQ6(1), DQ2	HLA A32(19), A28, B51(5), B61(40), Bw4, Bw6, Cw2, Cw7, DR4, DR13(6), DR52, DR53, DQ6(1), DQ8(3)	1,1,1
9	N.U.	I	0%	HLA A1, B8, B57(17), Bw4, Bw6, Cw6, Cw7, DR17(3), DR7, DR52, DR53, DQ2, DQ9(3)	HLA A1, A26(10), B8, B57(17), Bw4, Bw6, Cw6, Cw7, DR3, DR7, DQ2, DQ3	1,0,1
10	K.A.	I	0%	HLA A2, A25(19), B18, B60(40), Bw6, Cw3, DR1, DR13(6), DR52, DQ5(1), DQ6(1)	HLA A2, A32(19), B38(16), B57(17), Bw4, Cw6, DR13(6), DR7, DR53, DQ6(1), DQ9(3)	1,2,1
11	L.H.	I	0%	HLA A2, A30(19), B27, B60(40), Bw4, Bw6, Cw2, Cw3, DR13(6), DR9, DR52, DR53, DQ6(1), DQ9(3)	HLA A2, A31(19), B27, B60(40), Bw4, Bw6, Cw2, Cw3, DR52, DQ5(1), DQ6(1)	1,0,1
12	V.E.	I	0%	HLA A1, B7, B27, Bw4, Bw6, Cw2, Cw7, DR11(5), DR13(6), DR52, DQ6(1), DQ7(3)	HLA A1, A69(28), B57(17), B61(40), Bw4, Bw6, Cw2, Cw6, DR11(5), DR7, DR52, DR53, DQ7(3), DQ9(3)	1,2,1
13	H.P.	II	0%	HLA A1, A25(10), B8, B18, Bw6, Cw7, DR1, DR17(3), DR52, DQ5(1), DQ2	HLA A1, A25(10), B8, B18, Bw6, Cw7, DR15(2), DR17(3), DR51, DR52, DQ1, DQ2	0,0,1
14	U.M.	II	0%	HLA A1, A2, B8, B18, Bw6, Cw7, DR17(3), DR11(5), DR52, DQ2, DQ7(3)	HLA A1, A2, B8, B18, Cw7, DR17(3), DR11(5), DR52, DQ2, DQ7(3)	0,0,0

15	B.N.	II	5%	HLA A2, A26(10), B7, B37, Bw4, Bw6, Cw2, Cw7, DR15(2), DR16(2), DR51, DQ5(1)	HLA A2, A24(9), B7, B44(12), Bw4, Bw6, Cw5, Cw7, DR15(2), DR4, DQ6(1), DQ7(3)	1,1,1
16	P.H.	II	0%	HLA A1, A2, B8, B13, Bw4, Bw6, Cw6, Cw7, DR17(3), DR7, DR52, DR53, DQ2	HLA A1, A2, B8, B13, Bw4, Bw6, Cw7, DR17(3), DR7, DR52, DR53, DQ2	0,0,0
17	K.L.	II	0%	HLA A2, B27, B41, Bw4, Bw6, Cw2, DR1, DR13(6), DR52, DQ5(1), DQ7(3)	HLA A2, A3, B56(22), B27, Bw4, Bw6, Cw2, Cw7, DR1, DR16(2), DR51, DQ5(1)	1,1,1
18	H.D.	II	0%	HLA A25(10), A33(19), B65(14), B18, Bw6, Cw8, DR1, DR4, DR53, DQ1, DQ8(3)	HLA A26(10), A33(19), B51(5), B64(14), Bw4, Bw6, Cw8, DR15(2), DR7, DR51, DR53, DQ6(1), DQ2	1,2,2
19	K.H. J	II	0%	HLA A3, A33(19), B7, B58(17), Bw4, Bw6, Cw3, Cw7, DR15(2), DR13(6), DR51, DR52, DQ1	HLA A3, A32(19), B7, Bw6, Cw7, DR13(6), DQ1	1,1,1
20	W.R.	II	0%	HLA A1, A11, B8, B35, Bw6, Cw4, Cw7, DR1, DR13(6), DR52, DQ5(1)	HLA A2, A11, B35, Bw6, Cw4, DR14(6), DR52, DQ1	1,1,2
21	Z.K.	II	0%	HLA A1, A11, B52(5), B8, Bw4, Bw6, Cw7, DR17(3), DR14(6), DR52, DQ1, DQ2	HLA A1, A11, B51(5), B8, Bw4, Bw6, Cw7, DR17(3), DR14(6), DR52, DQ5(1), DQ2	0,1,0
22	S.J.	II	0%	HLA A1, A3, B7, B8, Bw6, Cw7, DR15(2), DR4, DR51, DR53, DQ6(1), DQ8(3)	HLA A3, A31(19), B7, B27, Bw4, Bw6, Cw2, DR15(2), DR4, DR51, DR53, DQ5(1), DQ8(3)	1,1,0

23	K.M.	III	0%	HLA A2, B7, B57(17), Bw4, Bw6, Cw6, Cw7, DR15(2), DR8, DR51, DQ6(1), DQ4	HLA A2, A25(10), B7, Bw6, Cw7, DR15(2), DR4, DR53, DQ6(1), DQ7(3)	1,1,1
24	H.M.	III	0%	HLA A3, B7, B60(40), Bw6, Cw3, Cw7, DR1, DR13(6), DR52, DQ5(1), DQ6(1)	HLA A3, A11, B7, B62(15), Bw6, Cw3, Cw7, DR1, DQ5(1)	1,1,1
25	K.B.	III	0%	HLA A1, A2, B12, B37, Bw4, Cw5, DR5, DR10, DR52, DQ1	HLA A24(9), A28, B7, B44(12), Bw4, Bw6, Cw7, DR15(2), DR11(5), DR51, DR52, DQ1, DQ7(1)	2,2,2
26	K.R.	III	0%	HLA A2, A24(9), B8, B44(12), Bw4, Bw6, Cw5, Cw7, DR11(5), DR14(6), DR52, DQ5(1), DQ7(3)	HLA A24(9), B44(12), Bw4, Cw2, DR11(5), DR13(6), DR52, DQ1, DQ3	1,1,1
27	T.KH .	III	0%	HLA A1, A69(28), B8, B57(17), Bw4, Bw6, Cw6, Cw7, DR17(3), DR7, DR52, DR53, DQ2, DQ9(3)	HLA A1, A29(19), B8, B57(17), Bw4, Bw6, Cw6, Cw7, DR17(3), DR8, DQ2, DQ4	1,0,1
28	B.H.	III	0%	HLA A1, A25(10), B8, B18, Bw6, Cw7, DR13(6), DR17(3), DR52, DQ6(1), DQ2	HLA A1, A11, B7, B8, Bw6, Cw7, DR15(2), DR17(3), DR51, DR52, DQ6(1), DQ2	1,1,1
29	O.U M.	III	0%	HLA A1, A2, B7, B8, Bw6, Cw7, DR15(2), DR17(3), DR51, DR52, DQ6(1), DQ2	HLA A2, B7, B8, Bw6, Cw7, DR15(2), DR3, DR52, DQ1, DQ2	1,0,1
30	J.R.	III	0%	HLA A3, A32(19), B7, B61(40), Bw6, Cw2, Cw7, DR1, DR15(2), DR51, DQ5(1)	HLA A3, A28, B7, B39(16), Bw6, Cw3, Cw7, DR15(2), DR16(2), DR51, DQ5(1), DQ6(1)	1,1,1

31	C.B.	III	0%	HLA A2, A3, B7, B18, Bw6, Cw5, Cw7, DR9, DR12(5), DR52, DR53, DQ7(3), DQ9(3)	HLA A2, A3, B35, B18, Bw6, Cw4, DR1, DR11(5), DR52, DQ1, DQ3	0,1,2
32	L.E.	III	0%	HLA A3, A25(10), B7, B35, Bw6, Cw7, DR1, DR12(5), DR52, DQ5(1), DQ7(3)	HLA A3, A11, B7, B35, Bw6, Cw4, Cw7, DR1, DR4, DR53, DQ1, DQ3	1,0,1
33	C.F.	III	0%	HLA A2, A3, B7, B18, Bw6, Cw5, Cw7, DR12(5), DR9, DR52, DR53, DQ3	HLA A3, A11, B7, B18, Bw6, Cw7, DR11(5), DR13(6), DR52, DQ1, DQ3	1,0,2
34	S.G.	III	0%	HLA A1, A2, B7, B18, Bw6, Cw7, DR15(2), DR13(6), DR51, DR52, DQ1	HLA A2, B7, B18, Bw6, Cw7, DR15(2), DR8, DR51, DQ1, DQ4	1,0,1
35	K.R.	III	0%	HLA A3, A11, B8, B60(40), Bw6, Cw3, Cw7, DR4, DR13(6), DR52, DR53, DQ6(1), DQ8(3)	HLA A32(19), A28, B51(5), B61(40), Bw4, Bw6, Cw2, Cw7, DR4, DR13(6), DR52, DR53, DQ6(1), DQ8(3)	2,2,0
36	H.S.	III	0%	HLA A2, A11, B62(15), B35, Bw6, Cw9(3), Cw4, DR13(6), DR14(6), DR52, DQ6(1)	HLA A2, A11, B7, B35, Bw6, Cw4, Cw7, DR1, DR8, DQ5(1), DQ4	0,1,2
37	M.C.	III	0%	HLA A1, A2, B57(17), B27, Bw4, Cw2, Cw6, DR7, DR9, DR53, DQ9(3)	HLA A1, A26(10), B51(5), B35, Bw4, Bw6, Cw4, DR7, DR9, DR53, DQ3	1,2,0

5.2 Bestimmungen eines geeigneten Monozytenspenders

In der vorliegenden Arbeit wurde mit durchflußzytometrischen Methoden nach non-HLA-Ak gesucht, die gegen Epitope gerichtet waren, die von Monozyten exprimiert werden. Die Monozytenpopulationsgröße und deren Abgrenzbarkeit zu den anderen Leukozytenpopulationen sind in Abhängigkeit vom Individuum variabel ausgeprägt. Deshalb musste in einem ersten Schritt nach einem/ einer Probanden/ -in gesucht werden, dessen/ deren Monozytenpopulation sich im Durchflußzytometer gut identifizieren ließ. Abbildung 7 zeigt die Messung einer Gesamtleukozytenpopulation fünf verschiedener Probanden (a-e). Dargestellt ist eine Zweiparameterpunktewolke (Dot Plot).

Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten haben unterschiedliche morphologische Eigenschaften. Sie unterscheiden sich in der Zellgröße und der Zellgranularität. Im Durchflußzytometer werden von jeder einzelnen Zelle die Zellgröße und die Zellgranularität durch das FSC bzw. SSC bestimmt, so dass sich die gesamte Leukozytenpopulation in die Monozyten-, Lymphozyten- und Granulozytenpopulation differenzieren lässt. Diese Aufteilung ist im Dot Plot a der Abbildung 7 gezeigt. Weiterhin demonstriert der Vergleich dieser fünf Dot Plot's, dass bei Proband a die Monozytenpopulation am ausgeprägtesten ist und sich gut von der Lymphozyten- und Granulozytenpopulation abgrenzen lässt. Da diese Eigenschaften bei den übrigen Probanden (b-e) eingeschränkt sind, wurden alle Untersuchungen in der Arbeit an den Monozyten von Proband a durchgeführt.

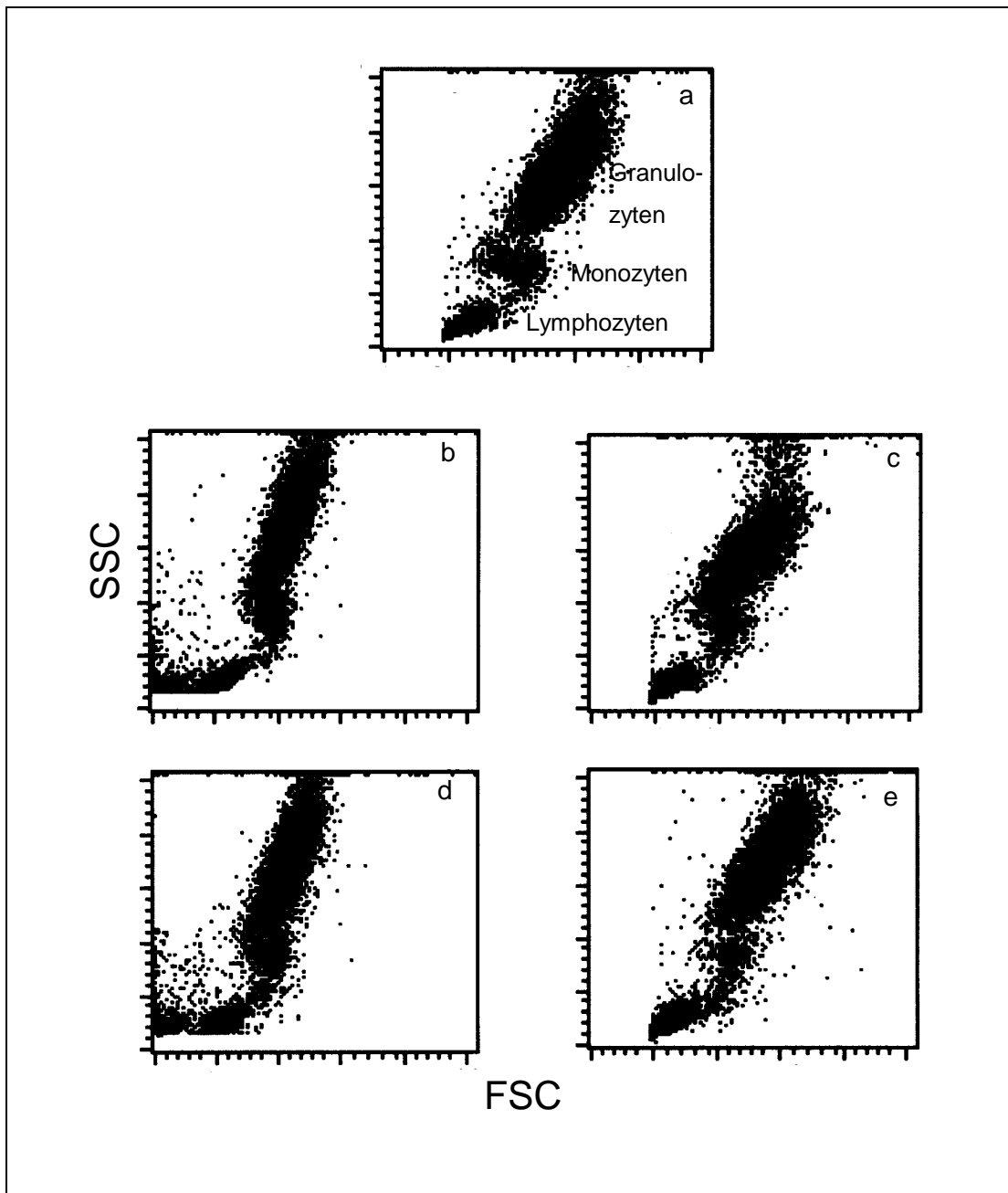


Abbildung 7: Dot Plot Vergleich von fünf verschiedenen gesunden Probanden zur Bestimmung eines geeigneten Monozytenspenders. In dieser Abbildung sind die Zweiparameterpunktewolken (Dot Plot) verschiedener gesunder Probanden (a-e) nebeneinander dargestellt. Die humanen Leukozyten wurden aus Vollblut gewonnen. FSC bezeichnet das Vorwärtstreulicht und SSC das Seitwärtstreulicht. Vorwärtstreulicht und Seitwärtstreulicht differenzieren die Leukozyten in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten. In Dot Plot a sind die Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten beschriftet.

5.3 Durchflußzytometrischer Nachweis der Expression der Antigene CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 auf Monozyten

Für den Nachweis der Antigene CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 auf Monozyten wurden Doppelfluoreszenzanalysen durchgeführt. Für die Anfärbung der Monozyten wurden folgende Antikörperkonstellationen gewählt:

- mAk H5C6 PE (gegen CD63)/ mAk M5E2 FITC (gegen CD14)
- mAk VIM15 FITC (gegen CDw92)/ mAk M5E2 PE (gegen CD14)
- mAk X-2 biotinyliert (gegen CD93) + PE Streptavidin/ mAk M5E2 FITC (gegen CD14)
- mAk B-T1 FITC (gegen CD102)/ M5E2 PE (gegen CD14)
- mAk 14A2H1 PE (gegen CD153)/ M5E2FITC (gegen CD14)

Anschließend erfolgten die Messungen am Durchflußzytometer. Die Auswertung wurde in einem Zweischrittverfahren durchgeführt. Zunächst wurde die Monozytenpopulation durch Setzen eines Analysefensters in Abhängigkeit vom Seitwärtsstreulicht und der CD14 Expression eindeutig identifiziert. Dieses Verfahren ist unter Punkt 4.4 beschrieben. Danach wurde im Histogramm die Expression des CD63 Antigens, CDw92 Antigens, CD93 Antigens, CD102 Antigens und CD151 Antigens für die identifizierten Monozyten dargestellt. Die Histogramme sind in Abbildung 8 aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass mindestens 90 % der Monozyten die Antigene CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 exprimieren. Die dargestellten Histogramme spiegeln typische Expressionsbilder wieder. Ähnliche Histogramme wurden bei Monozyten für die Antigene CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 in der Literatur beschrieben (Steinberger et al., 2002; Becton Dickinson Biosciences, 2000; Majdic et al., 1995).

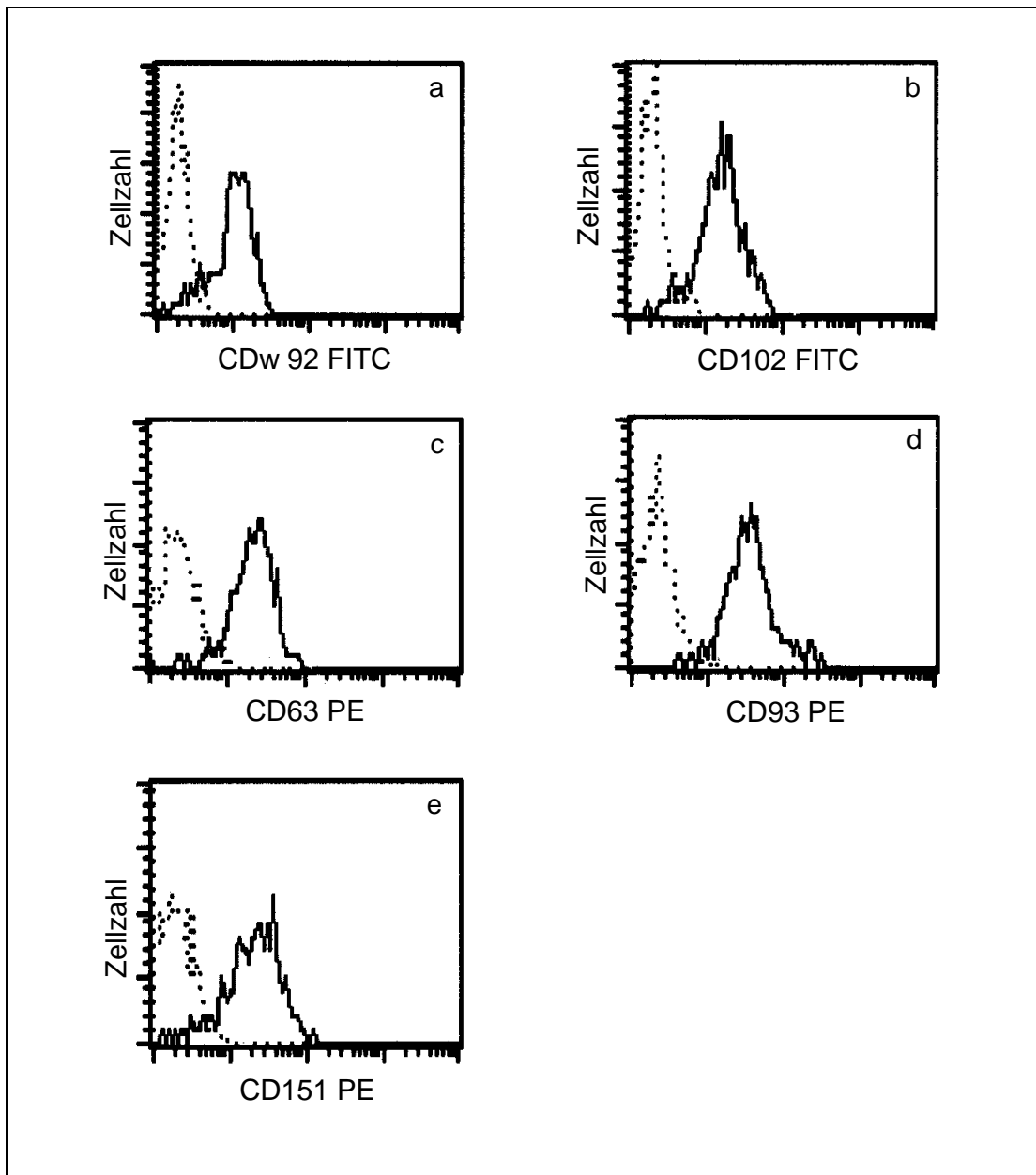


Abbildung 8: Nachweis der Antigene CDw92, CD102, CD63, CD93 und CD151 auf Monozyten. Die Monozyten wurden durch ein Analysefenster identifiziert. Das Verfahren zum Setzen des Analysefensters ist unter Punkt 4.4 beschrieben. Dargestellt ist im Histogramm a der Nachweis der Expression des CDw92 Antigens mit dem mAk VIM15, im Histogramm b der Nachweis der Expression des Antigens CD102 mit dem mAk B-T1, im Histogramm c der Nachweis der Expression des Antigens CD 63 mit dem mAk H5C6, im Histogramm d der Nachweis der Expression des Antigens CD93 mit dem mAk X-2 und im Histogramm e der Nachweis ist der Expression des Antigens CD151 mit dem mAk 14A2H1. Die gepunktete Kurve stellt jeweils die Negativkontrolle, in welcher die Monozyten ohne mAk inkubiert wurden dar.

5.4 Bestimmung der Nachweisgrenze von CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 Antikörpern mit der Durchflußzytometrie

Ziel der Arbeit war es, zu analysieren, ob in den Seren von Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen non-HLA-Ak vorhanden sind, die gegen die monozytär exprimierten Epitope gerichtet sind, die durch die mAk VIM15, B-T1, H5C6, 14A2H1 und X-2 vorgegeben wurden. Als Nachweisverfahren für die non-HLA-Ak wurden Blockierungsexperimente gewählt. Dabei musste zuerst überprüft werden, bis zu welcher Konzentration non-HLA-Ak durch Blockierungsexperimente mit Hilfe der Durchflußzytometrie nachgewiesen werden können. Durch Blockierungsexperimente können Aussagen zur Sensitivität des Verfahrens getroffen werden. Am Beispiel des mAk X-2 soll das Verfahren erklärt werden.

Monozyten wurden zunächst mit dem biotinylierten mAk X-2 in Kombination mit Streptavidin angefärbt. Es ergab sich eine Ausgangsfluoreszenzintensität, die in Abbildung 9 im Histogramm a dargestellt ist. In den nächsten Experimenten wurden zu den biotinylierten mAk X-2, unbiotinylierte mAk X-2 in den Verdünnungsstufen von unverdünnt bis 1:320 verdünnt zugegeben. Dadurch wurde eine Konkurrenzsituation geschaffen, denn der biotinylierte und der unbiotinylierte mAk X-2 konkurrieren um dasselbe Epitop. Je höher die Konzentration des unbiotinylierten mAk X-2 ist, desto mehr Epitope wird dieser belegen und desto weniger Epitope können von dem biotinylierten mAk X-2 besetzt werden. Daraus folgt, dass die Ausgangsfluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des unbiotinylierten mAk X-2 abgeschwächt wird. Dieses Phänomen ist in den Histogrammen c bis k der Abbildung 9 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Ausgangsfluoreszenz (gestrichelte Linie) bei Anwesenheit des unverdünnten unbiotinylierten mAk X-2 (durchgezogene Linie) stark abgeschwächt wird. Die Abschwächung erreicht den höchsten Grad in Histogramm b, weil hier die Kurve (durchgezogene Linie) am weitesten nach links verschoben ist. Bei den nächsten Verdünnungsstufen wurden die Kurven immer mehr in Richtung zum Histogramm a mit der Ausgangsfluoreszenz (gestrichelte Linie) verschoben. Bei der Verdünnung von 1:80 ist das Histogramm mit dem

Histogramm der Ausgangsfluoreszenzintensität deckungsgleich. Das bedeutet, dass bis zu dieser Verdünnungsstufe Ak, die gegen das X-2 spezifische Epitop gerichtet sind, durch die dargestellten Blockierungsexperimente nachgewiesen werden.

Die Hemmung für die Ausgangsfluoreszenzintensität konnte in Abhängigkeit von der Verdünnung des unbiotinylierten mAk X-2 graphisch dargestellt werden. Diese Graphik ist in Abbildung 10 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass ab einer Verdünnung von 1:80 (Schnittpunkt der Gerade mit der X- Achse) des unbiotinylierten mAk X-2 im Ansatz keine Hemmung der Ausgangsfluoreszenzintensität mehr erfolgt. Hieraus ist ersichtlich, dass Ak, die gegen das X-2 spezifische Epitop gerichtet sind, bis zu dieser Verdünnung durch die gewählten Blockierungsexperimente nachgewiesen werden können. Nach dem gleichen Verfahren sind für die unmarkierten mAk H5C6, VIM15, B-T1 und 14A2H1 die Nachweisgrenzen bestimmt worden und in den Abbildungen 11-14 graphisch dargestellt. Da die Ausgangskonzentrationen der unmarkierten mAk bekannt waren, konnte jeweils die Konzentration, ab welcher keine Hemmung der Ausgangsfluoreszenz mehr vorlag, rechnerisch ermittelt werden. Die Spannbreite für die Nachweisgrenzen reicht von 0,025 mg/ml bis hin zu 0,00125 mg/ml. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

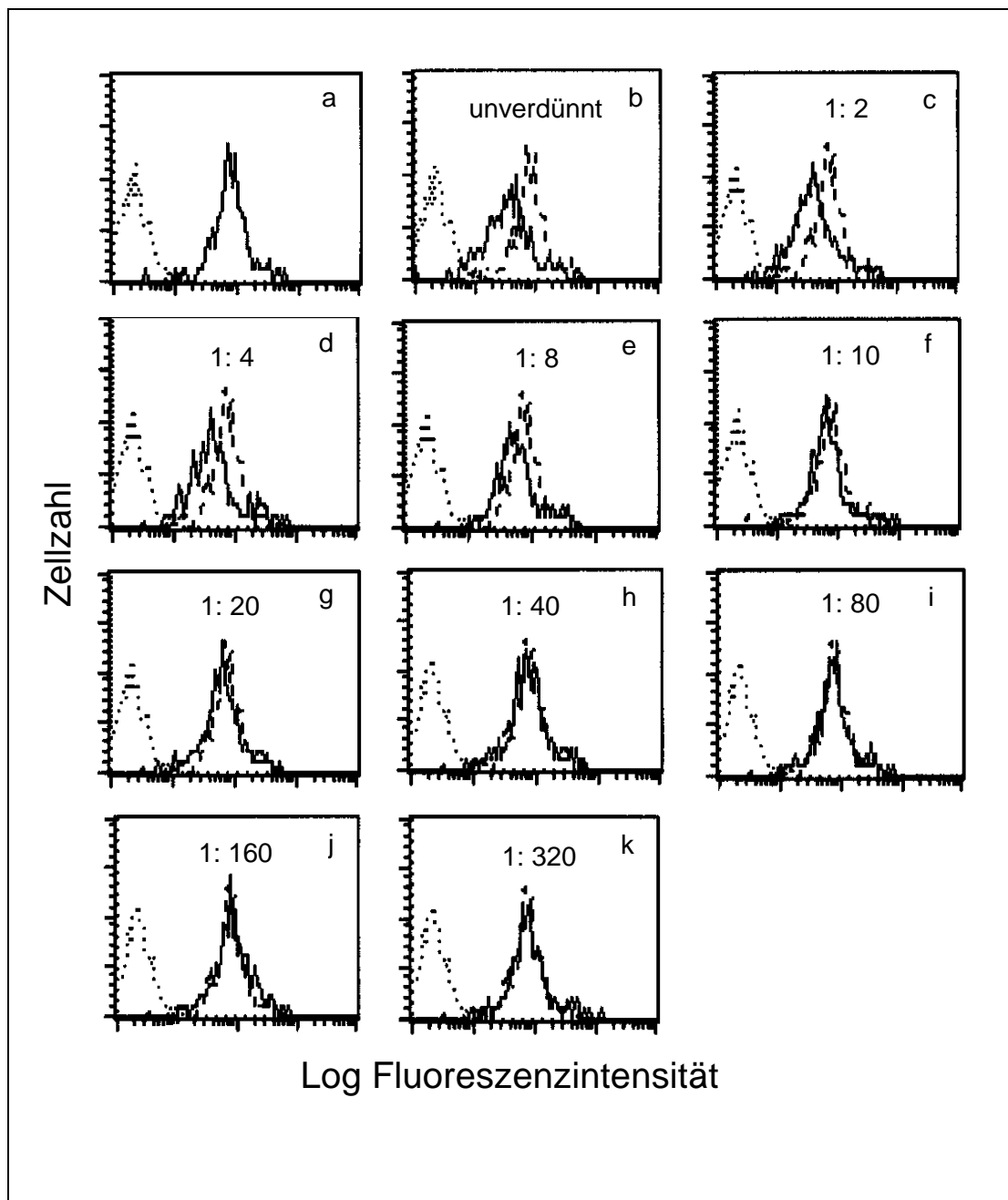


Abbildung 9: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Nachweisgrenze von Antikörpern am Beispiel des unmarkierten mAk X-2 gegen CD93. Die Monozyten wurden durch ein CD14/ SSC Analysefenster identifiziert. Im Histogramm a wurden Monozyten mit dem biotinylierten mAk X-2 in Kombination mit Streptavidin PE angefärbt (durchgezogene Linie). In den Histogrammen b-k wurden zum Färbeansatz unbiotinylierte mAk X-2 in den jeweils angegebenen Verdünnungsstufen zum Färbeansatz zugegeben. Die gestrichelte Linie in den Histogrammen b-k markiert die Ausgangsfluoreszenz aus Histogramm a und die durchgezogene Linie zeigt die Fluoreszenzintensität für den biotinylierten mAk X-2 in Kombination mit Streptavidin PE in Anwesenheit mit dem unbiotinylierten mAk X-2 in der jeweiligen Verdünnungsstufe. Die gepunktete Linie entspricht dem Leeransatz (Monozyten ohne Ak).

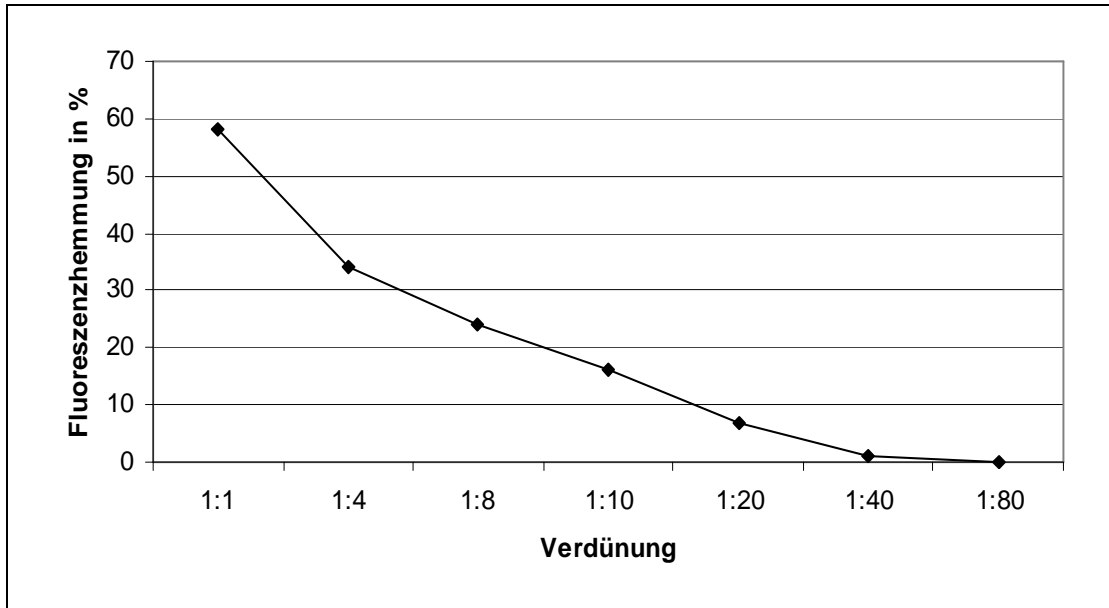


Abbildung 10: Darstellung der Nachweisgrenze des unbiotinylierten mAk X-2. Auf der Y-Achse ist die Fluoreszenzhemmung in % angegeben. Sie wurde aus der Fluoreszenzintensität (Mean-Wert) der Histogramme mit den unterschiedlich konzentrierten unbiotinylierten mAk X-2 berechnet. Auf der X-Achse sind die Verdünnungsstufen des unbiotinylierten mAk X-2 angegeben. Der Schnittpunkt der Kurve mit der X-Achse gibt die Nachweisgrenze an.

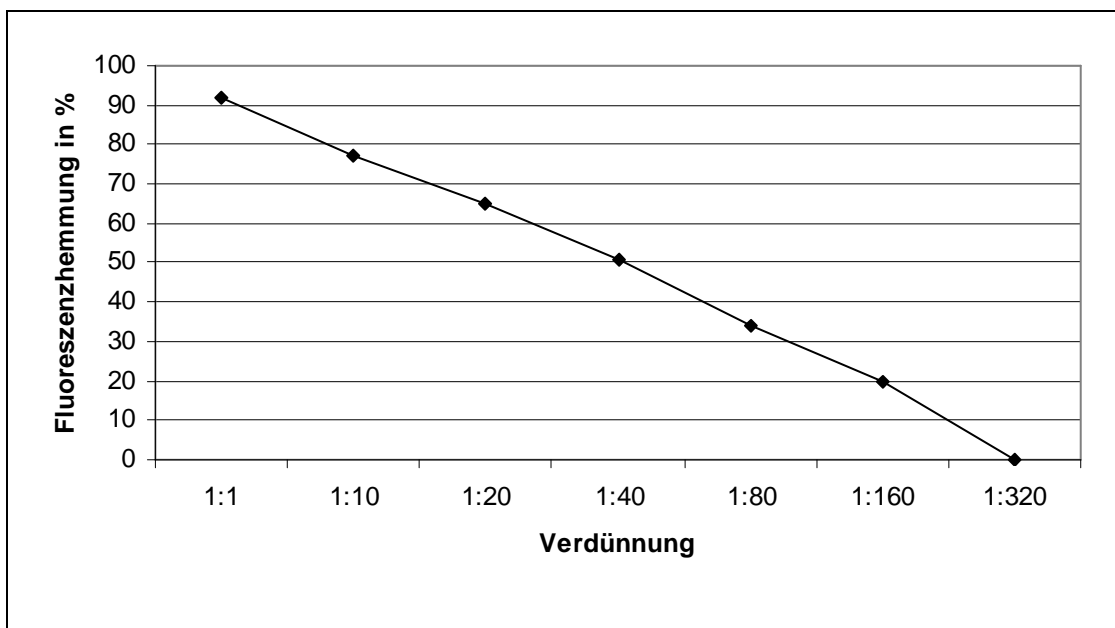


Abbildung 11: Darstellung der Nachweisgrenze des mAk H5C6. Auf der Y-Achse ist die Fluoreszenzhemmung in % angegeben. Sie wurde aus der Fluoreszenzintensität (Mean-Wert) der Histogramme mit den unterschiedlich verdünnten mAk H5C6 berechnet. Auf der X-Achse sind die Verdünnungsstufen des mAk H5C6 angegeben. Der Schnittpunkt der Kurve mit der X-Achse gibt die Nachweisgrenze an.

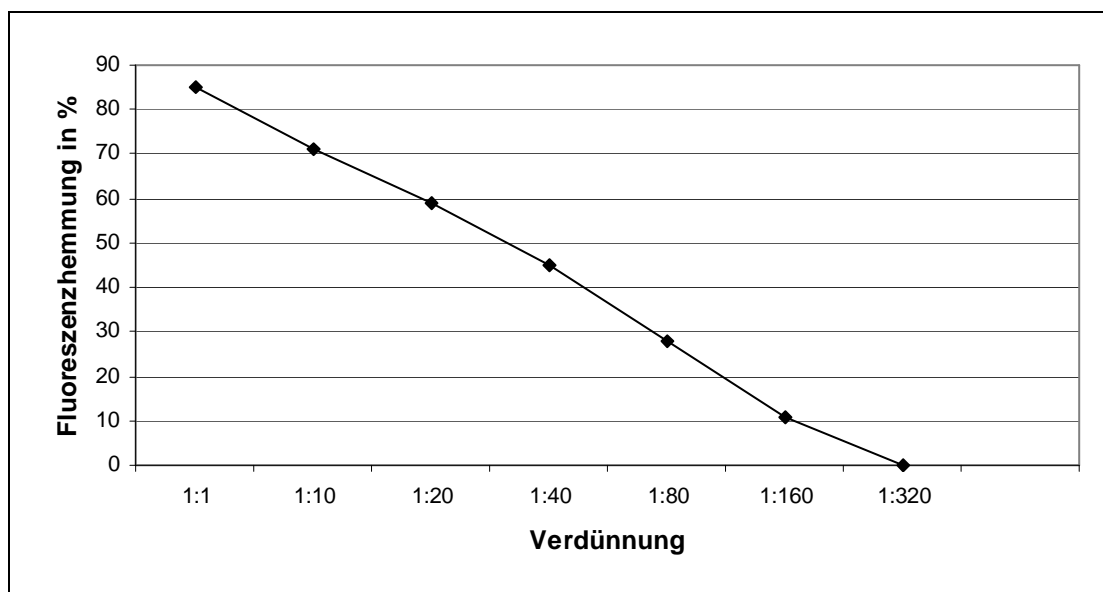


Abbildung 12: Darstellung der Nachweisgrenze des mAk VIM15. Auf der Y-Achse ist die Fluoreszenzhemmung in % angegeben. Sie wurde aus der Fluoreszenzintensität (Mean-Wert) der Histogramme mit den unterschiedlich verdünnten mAk VIM15 berechnet. Auf der X-Achse sind die Verdünnungsstufen des mAk VIM15 angegeben. Der Schnittpunkt der Kurve mit der X-Achse gibt die Nachweisgrenze an.

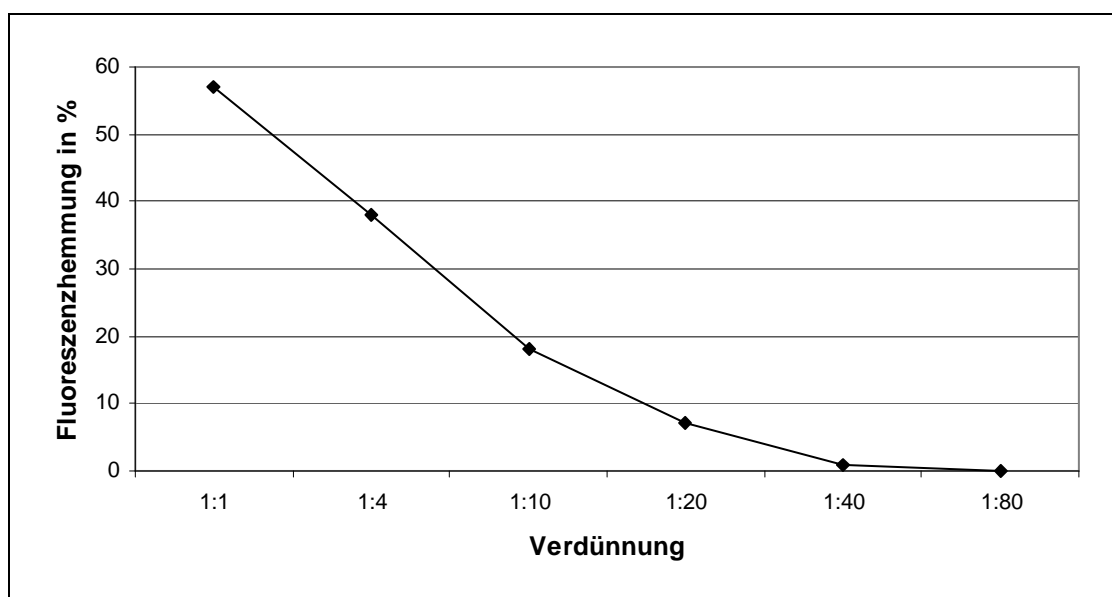


Abbildung 13: Darstellung der Nachweisgrenze des mAk B-T1. Auf der Y-Achse ist die Fluoreszenzhemmung in % angegeben. Sie wurde aus der Fluoreszenzintensität (Mean-Wert) der Histogramme mit den unterschiedlich verdünnten mAk B-T1 berechnet. Auf der X-Achse sind die Verdünnungsstufen des mAk B-T1 angegeben. Der Schnittpunkt der Kurve mit der X-Achse gibt die Nachweisgrenze an.

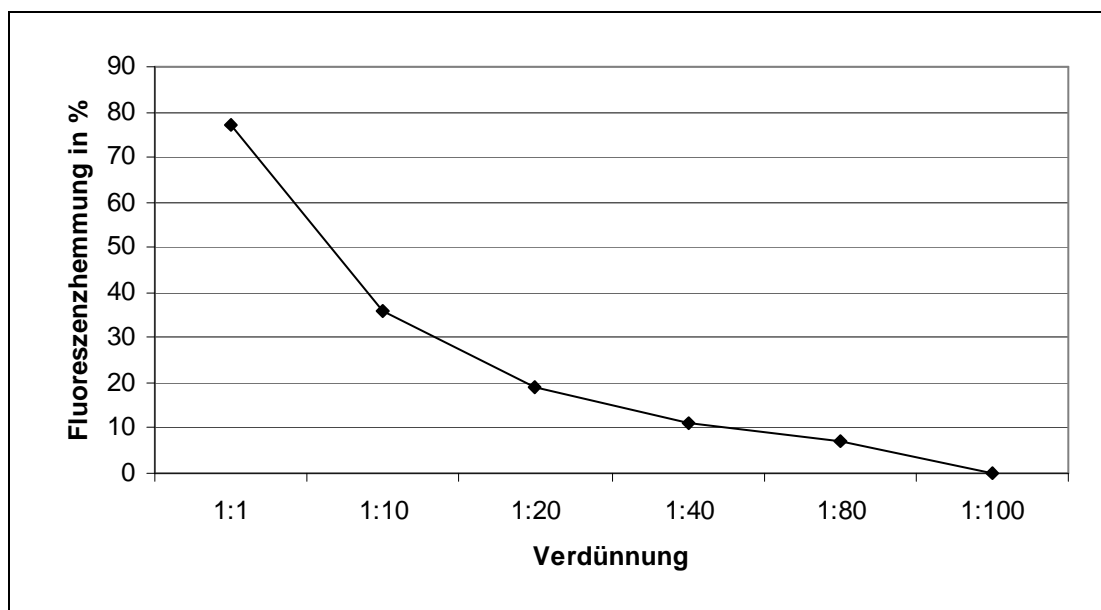


Abbildung 14: Darstellung der Nachweisgrenze des mAk 14A2H1. Auf der Y-Achse ist die Fluoreszenzhemmung in % angegeben. Sie wurde aus der Fluoreszenzintensität (Mean-Wert) der Histogramme mit den unterschiedlich verdünnten mAk 14A2H1 berechnet. Auf der X-Achse sind die Verdünnungsstufen des mAk 14A2H1 angegeben. Der Schnittpunkt der Kurve mit der X-Achse gibt die Nachweisgrenze an.

Tabelle 7: Nachweisgrenze der verwendeten unmarkierten mAk

unmarkierter mAk	Ausgangskonzentration in mg/ ml	Nachweisgrenze Verdünnung	Nachweisgrenze Konzentration in mg/ml
H5C6	0,5	1:320	0,0016
VIM15	0,5	1:320	0,0016
X-2	0,2	1:80	0,025
B-T1	0,1	1:80	0,00125
14A2H1	0,5	1:100	0,005

5.5 Fehlender Nachweis von non-HLA-Ak gegen ausgewählte Epitope auf den Adhäsionsmolekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 in Patientenseren vor und nach Nierentransplantation

Durch die vorherigen Blockierungsexperimente wurden jeweils die Nachweisgrenzen für Ak festgelegt, die gegen Epitope gerichtet sind, die durch die mAk H5C6, VIM15, X-2, B-T1 und 14A2H1 definiert worden sind. Analog zu den Blockierungsexperimenten wurde mit einem ähnlichen Versuchsansatz getestet, ob in den Seren von nierentransplantierten Patienten/ -inen non-HLA-Ak vorhanden sind, die gegen das H5C6-, das VIM15-, das X-2-, das B-T1- und das 14A2H1-spezifische Epitop gerichtet sind. Diese Epitope sind auf den monozytären Adhäsionsmolekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 lokalisiert. Es wurden insgesamt 111 Seren von 37 nierentransplantierten Patienten untersucht. Sie stammen wie in Kapitel 4 Punkt 4.1.3 beschrieben, aus drei verschiedenen Patientenkollektiven. Die zu testenden Seren wurden vor und nach Nierentransplantation gewonnen.

Zunächst erfolgte die Anfärbung der Monozyten mit folgenden mAk Kombinationen:

- VIM15-FITC (CDw92)/ M5E2-PE (CD14)
- B-T1-FITC (CD102)/ M5E2-PE (CD14)
- H5C6-PE (CD63)/ M5E2-FITC (CD14)
- 14A2H1-PE (CD151)/ M5E2-FITC (CD14)
- X-2(CD93)/ Streptavidin PE/ M5E2-FITC (CD14)

Bei den Färbeansätzen wurde die Monozytenpopulation durch die M5E2-(CD14-) Fluoreszenzintensität in Kombination mit dem SSC identifiziert. Das Verfahren ist in Punkt 4.4 beschrieben. Anschließend wurde für die identifizierte Monozytenpopulation die Reaktivität mit den jeweiligen aufgelisteten adhäsionsmolekülspezifischen Antikörper in einem Histogramm dargestellt. Die Reaktivität spiegelte sich in der ermittelten Fluoreszenzintensität wieder, die als Ausgangsfluoreszenzintensität bezeichnet wird. Danach wurde der ursprüngliche Versuchsansatz modifiziert, indem Patientenserum zum Versuchsansatz hinzu gegeben wurde. Es entsteht eine Konkurrenzsituation, wenn in den Seren non-HLA-Ak

gegen die Epitope anwesend sind, die durch die mAk definiert werden. In diesem Fall konkurrieren die markierten mAk mit dem in den Seren vorhandenen non-HLA-Ak um die gleiche Epitopbindungsstelle. Im Histogramm wird dies durch eine Abschwächung der Ausgangsfluoreszenzintensität und somit einer Linksverschiebung der Kurve deutlich. Fehlen derartige non-HLA-Ak im Serum, so bleibt die Ausgangsfluoreszenzintensität unverändert. Um die Funktionstüchtigkeit für die einzelnen Versuchsansätze zu dokumentieren, wurde eine Positivkontrolle mitgeführt. Hier wurde anstatt des Patientensерums jeweils der unmarkierte mAk zum Versuchsansatz gegeben, so dass die Ausgangsfluoreszenzintensität durch die unmarkierten mAk reduziert wurde. Die Histogramme in Abbildung 15 zeigen das beschriebene Verfahren detailliert am Beispiel des mAk VIM15, der gegen das Antigen CDw92 gerichtet ist. Die Histogramme a1-d1 zeigen die Reaktivität des mAk VIM15-FITC für die Monozytenpopulation. Es ergibt sich jeweils eine Ausgangsfluoreszenzintensität. Im Histogramm a2 ist die Fluoreszenzintensität für den mAk VIM15-FITC dargestellt, wenn parallel der unmarkierter VIM15 mAk im Versuchsansatz präsent ist. Im Histogramm a3 ist die Ausgangsfluoreszenzintensität mit der Fluoreszenzintensität aus dem Histogramm a2 überlagert dargestellt. Es ist ersichtlich, dass sich die Fluoreszenzintensität aus dem Histogramm a2 im Bereich der Negativkontrolle bewegt und damit deutlich schwächer als die Ausgangsfluoreszenzintensität ist. Damit zeigt diese Positivkontrolle, dass der Versuchsansatz geeignet ist, um non-HLA-Ak nachzuweisen, die spezifisch für das VIM15 Epitop sind. Die Histogramme b2-d2 zeigen die Fluoreszenzintensität, wenn sich Patientenserum im Ansatz befindet. In den Histogrammen b3-d3 wurden die Histogramme aus b1 und b2, c1 und c2 sowie d1 und d2 jeweils überlagert dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Histogramme in der Überlagerung deckungsgleich sind. Das bedeutet, dass in den Seren die von einem Patienten vor der Nierentransplantation (b2), unmittelbar nach der Nierentransplantation (c2) und drei Wochen nach Nierentransplantation (d2) gewonnen worden sind, keine non-HLA-Ak vorhanden sind, die gegen das VIM15 spezifische Epitop gerichtet sind. Für alle untersuchten Patientenserum wurde das gleiche Ergebnis erzielt.

Hieraus ergibt sich, dass in keinem Patientenserum vor, unmittelbar nach und drei Wochen nach Nierentransplantation ein non-HLA-Ak vorhanden war, der spezifisch für das VIM15 definierte Epitop war.

Die weiteren Abbildungen 16 bis 19 zeigen repräsentative Ergebnisse für die mAk B-T1 (Abb.16), H5C6 (Abb.17), X-2 (Abb.18) und 14A2H1 (Abb.19). Dabei ist in den Abbildungen zu erkennen, dass die Histogramme in b3-d3 jeweils deckungsgleich sind. Hieraus ergibt sich, dass in den Seren keine non-HLA-Ak vorhanden sind, die mit den Epitopen reagieren, die durch die mAk B-T1, H5C6, X-2 und 14A2H1 vorgegeben wurden.

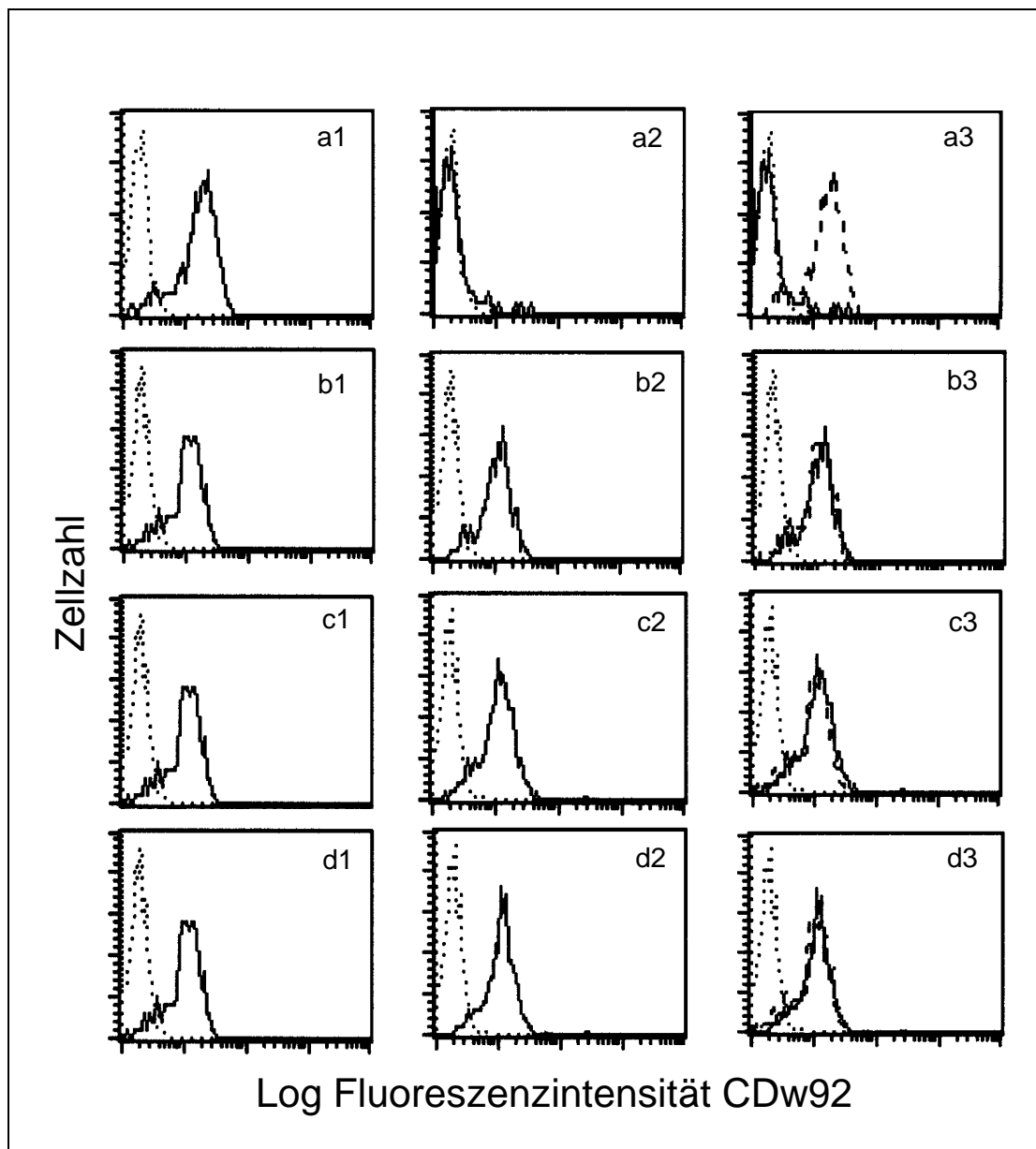


Abbildung 15: Reaktionsverhalten des mAk VIM15-FITC in Anwesenheit von nierentransplantierten Patientenserum. Die Identifizierung der Monozyten erfolgte durch das CD14/ SSC Analysefenster. Die Monozyten wurden mit dem mAk VIM15-FITC markierten angefärbt, der gegen das Antigen CDw92 gerichtet ist. Die gemessene Fluoreszenzintensität symbolisiert die Ausgangsfluoreszenz und wurde als durchgezogene Linie in den Histogrammen a1-d1 dargestellt. Die gepunktete Linie entspricht dem Leeransatz. Die Histogramme a2-d2 zeigen jeweils die gemessene Fluoreszenzintensität nach Zugabe des unmarkierten mAk VIM15 (a2), des vor NTX (b2) und nach NTX (c2 und d3) gewonnenen Patientenserums. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten aus den Histogrammen a1 und a2 in a3, b1 und b2 in b3, c1 und c2 in c3, d1 und d2 in d3 übereinander gelagert. Die Ausgangsfluoreszenzintensität entspricht der gestrichelten Linie und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe des unmarkierten mAk (a3) bzw. Patientenserums wird jeweils durch die durchgezogene Linie dargestellt (b3-d3).

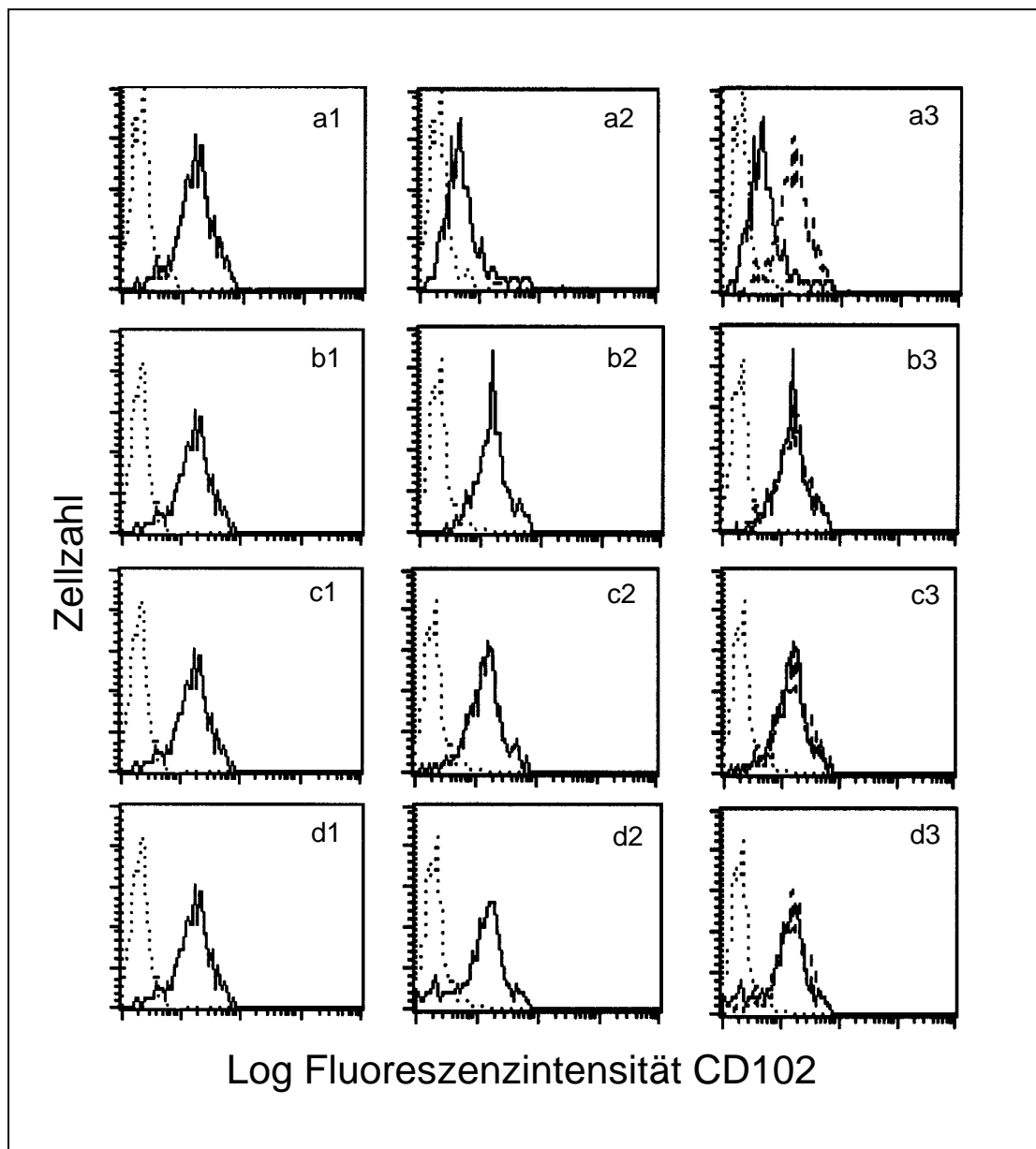


Abbildung 16: Reaktionsverhalten des mAk B-T1-FITC in Anwesenheit von nierentransplantierten Patientenserum. Die Identifizierung der Monozyten erfolgte durch das CD14/ SSC Analysefenster. Die Monozyten wurden mit dem mAk B-T1-FITC markierten angefärbt, der gegen das Antigen CD102 gerichtet ist. Die gemessene Fluoreszenzintensität symbolisiert die Ausgangsfluoreszenz und wurde als durchgezogene Linie in den Histogrammen a1-d1 dargestellt. Die gepunktete Linie entspricht dem Leeransatz. Die Histogramme a2-d2 zeigen jeweils die gemessene Fluoreszenzintensität nach Zugabe des unmarkierten mAk B-T1 (a2), des vor NTX (b2) und nach NTX (c2 und d3) gewonnenen Patientenserums. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten aus den Histogrammen a1 und a2 in a3, b1 und b2 in b3, c1 und c2 in c3, d1 und d2 in d3 übereinander gelagert. Die Ausgangsfluoreszenzintensität entspricht der gestrichelten Linie und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe des unmarkierten mAk (a3) bzw. Patientenserums wird jeweils durch die durchgezogene Linie dargestellt (b3-d3).

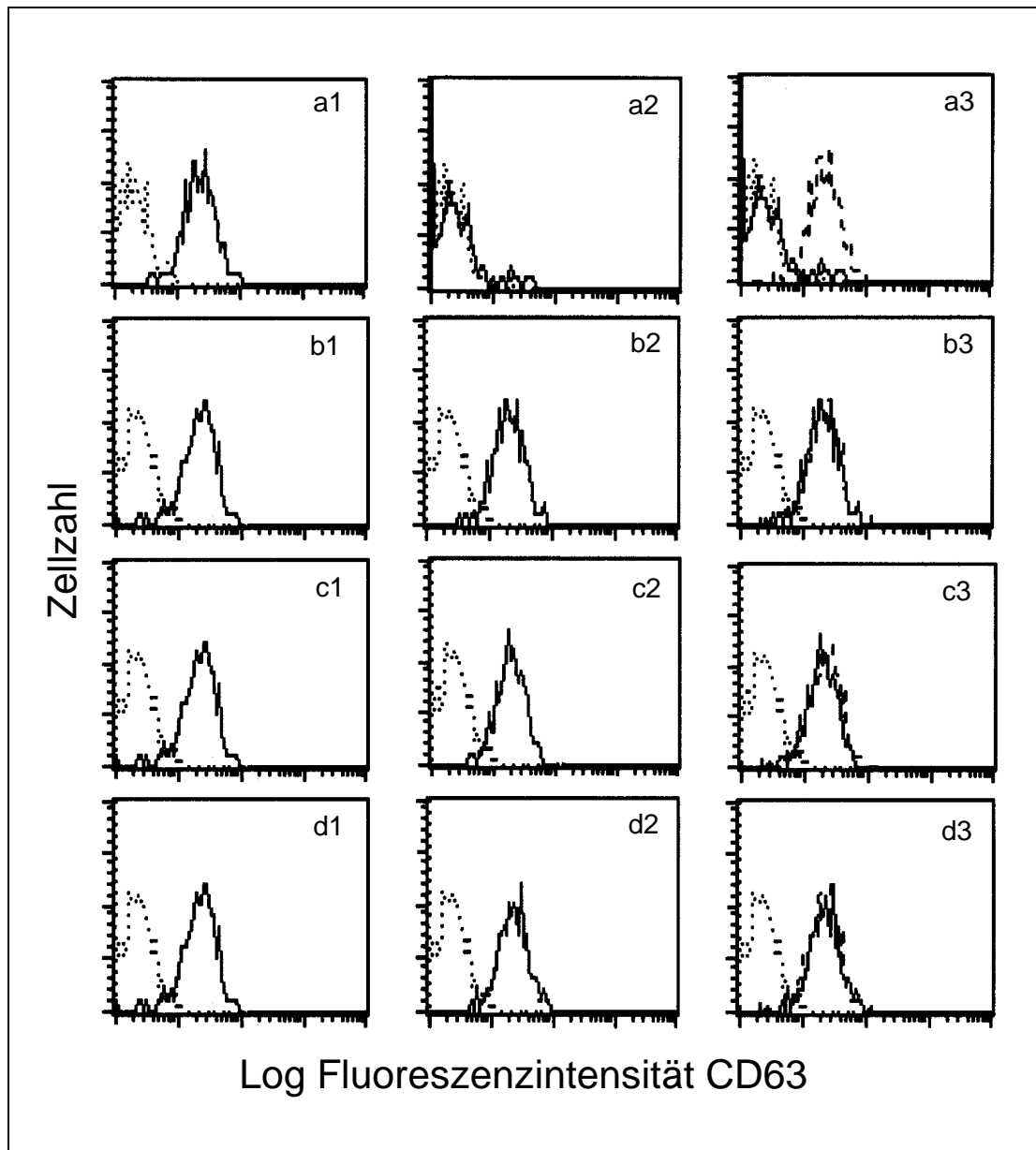


Abbildung 17: Reaktionsverhalten des mAk H5C6-PE in Anwesenheit von nierentransplantierten Patientenserum. Die Identifizierung der Monozyten erfolgte durch das CD14/ SSC Analysefenster. Die Monozyten wurden mit dem mAk H5C6-PE markierten angefärbt, der gegen das Antigen CD63 gerichtet ist. Die gemessene Fluoreszenzintensität symbolisiert die Ausgangsfluoreszenz und wurde als durchgezogene Linie in den Histogrammen a1-d1 dargestellt. Die gepunktete Linie entspricht dem Leeransatz. Die Histogramme a2-d2 zeigen jeweils die gemessene Fluoreszenzintensität nach Zugabe des unmarkierten mAk H5C6 (a2), des vor NTX (b2) und nach NTX (c2 und d3) gewonnenen Patientenserums. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten aus den Histogrammen a1 und a2 in a3, b1 und b2 in b3, c1 und c2 in c3, d1 und d2 in d3 übereinander gelagert. Die Ausgangsfluoreszenzintensität entspricht der gestrichelten Linie und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe des unmarkierten mAk (a3) bzw. Patientenserums wird jeweils durch die durchgezogene Linie dargestellt (b3-d3).

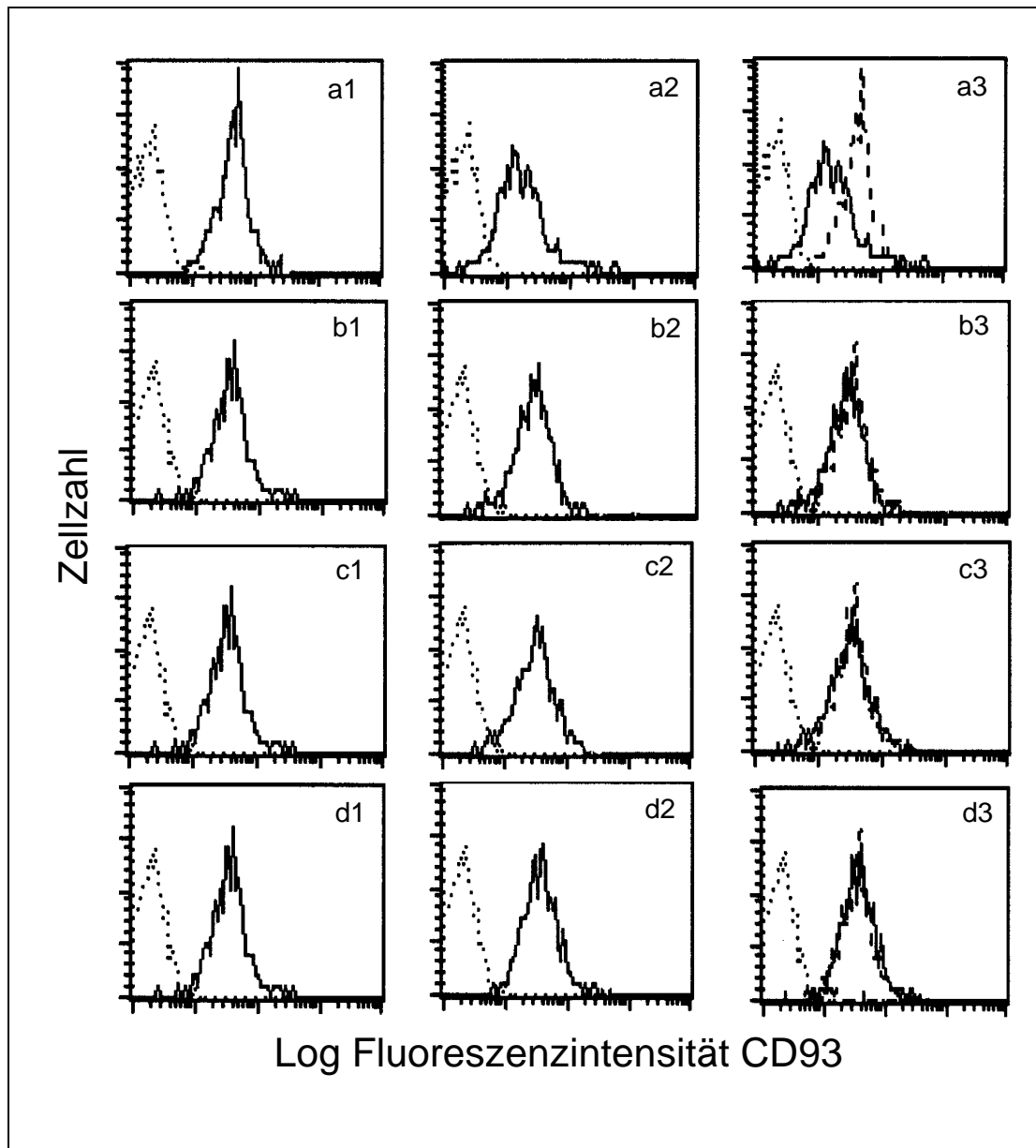


Abbildung 18: Reaktionsverhalten des mAk X-2-PE in Anwesenheit von nierentransplantierten Patientenserum. Die Identifizierung der Monozyten erfolgte durch das CD14/ SSC Analysefenster. Die Monozyten wurden mit dem mAk X-2-PE markierten angefärbt, der gegen das Antigen CD93 gerichtet ist. Die gemessene Fluoreszenzintensität symbolisiert die Ausgangsfluoreszenz und wurde als durchgezogene Linie in den Histogrammen a1-d1 dargestellt. Die gepunktete Linie entspricht dem Leeransatz. Die Histogramme a2-d2 zeigen jeweils die gemessene Fluoreszenzintensität nach Zugabe des unmarkierten mAk X-2 (a2), des vor NTX (b2) und nach NTX (c2 und d3) gewonnenen Patientenserums. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten aus den Histogrammen a1 und a2 in a3, b1 und b2 in b3, c1 und c2 in c3, d1 und d2 in d3 übereinander gelagert. Die Ausgangsfluoreszenzintensität entspricht der gestrichelten Linie und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe des unmarkierten mAk (a3) bzw. Patientenserums wird jeweils durch die durchgezogene Linie dargestellt (b3-d3).

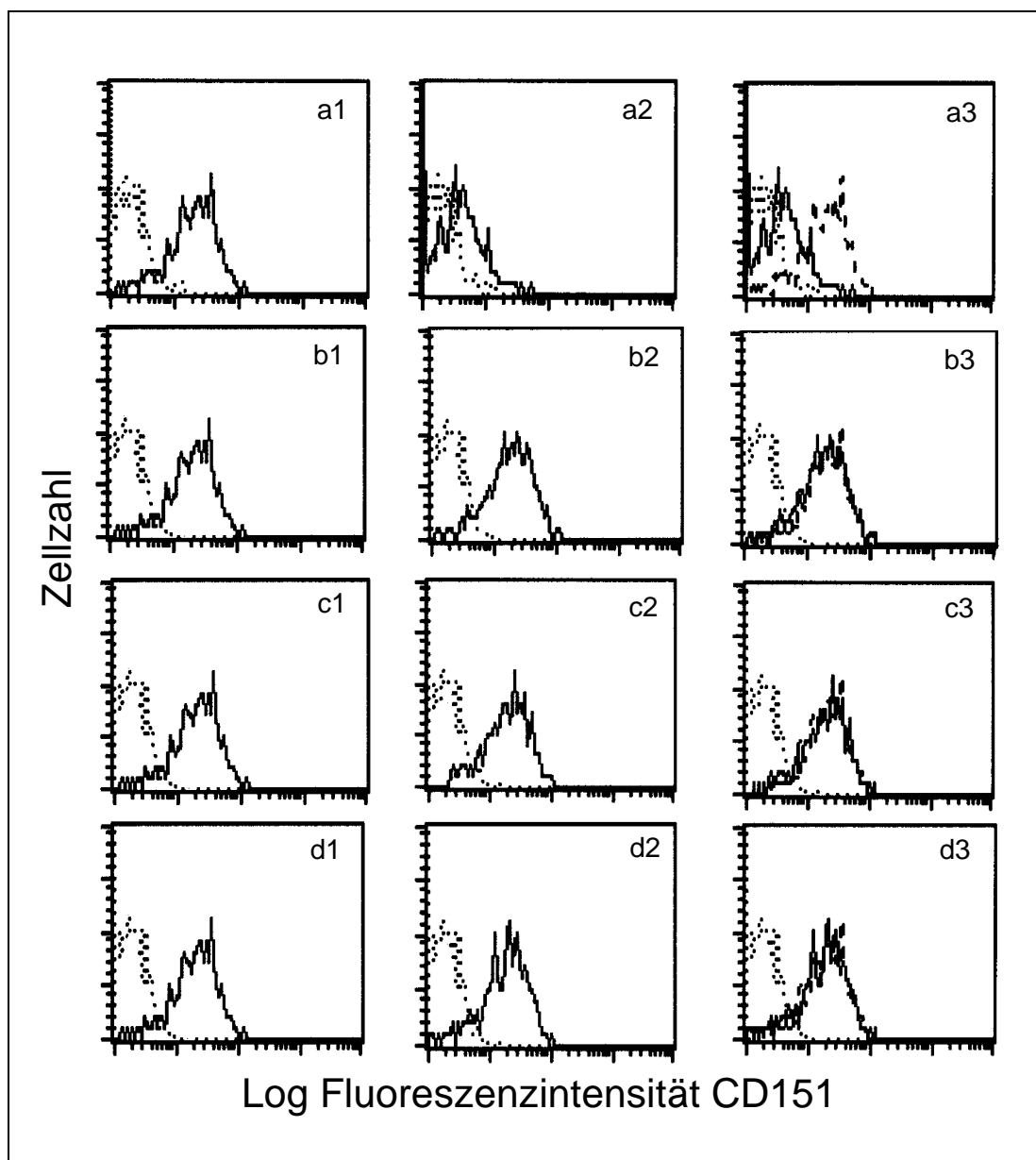


Abbildung 19: Reaktionsverhalten des mAk 14A2H1-PE in Anwesenheit von nierentransplantierten Patientenserum. Die Identifizierung der Monozyten erfolgte durch das CD14/ SSC Analysefenster. Die Monozyten wurden mit dem mAk 14A2H1-PE markierten angefärbt, der gegen das Antigen CD151 gerichtet ist. Die gemessene Fluoreszenzintensität symbolisiert die Ausgangsfluoreszenz und wurde als durchgezogene Linie in den Histogrammen a1-d1 dargestellt. Die gepunktete Linie entspricht dem Leeransatz. Die Histogramme a2-d2 zeigen jeweils die gemessene Fluoreszenzintensität nach Zugabe des unmarkierten mAk 14A2H1 (a2), des vor NTX (b2) und nach NTX (c2 und d3) gewonnenen Patientenserums. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten aus den Histogrammen a1 und a2 in a3, b1 und b2 in b3, c1 und c2 in c3, d1 und d2 in d3 übereinander gelagert. Die Ausgangsfluoreszenzintensität entspricht der gestrichelten Linie und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe des unmarkierten mAk (a3) bzw. Patientenserums wird jeweils durch die durchgezogene Linie dargestellt (b3-d3).

Um die in den Histogrammen dargestellten Ergebnisse zu verifizieren wurden die Mittelwerte der ermittelten Fluoreszenzintensitäten und deren Standardabweichungen für die einzelnen Proben berechnet und in Tabelle 8 aufgelistet. Anschließend wurden die Werte aus der Tabelle 8 jeweils in Säulendiagrammen graphisch dargestellt (Abb. 20-24). Auch hier wird im Vergleich zur Positivprobe deutlich, dass die Ausgangsfluoreszenz nach Zugabe des vor und nach NTX gewonnenem Patientensерums nicht gehemmt wurde. Diese Ergebnisse wurden für sämtliche untersuchten Seren erzielt. Zusammengefasst resultiert, dass in den vor und nach NTX gewonnen Seren von 37 nierentransplantierten Patienten keine non-HLA-Ak gegen die durch die mAk B-T1, VIM15, H5C6, X-2 und 14A2H1 definierten Epitope auf den Adhäsionsmolekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 gefunden werden konnten.

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichung der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der untersuchten Proben

	MFI CD63*	MFI CDw92*	MFI CD93*	MFI CD102*	MFI CD151*
Ausgangsfluoreszenz/ Probe ohne Serum	33,29 ± 0,93	12,77 ± 0,75	31,4 ± 1,28	10,64 ± 0,89	19,28 ± 0,49
Positivprobe	20,17 ± 0,95	7,83 ± 0,45	13,27 ± 1,11	4,6 ± 0,5	6,17 ± 0,35
Koll. I vor NTX	32,6 ± 1,07	12,68 ± 0,59	30,81 ± 1,10	10,63 ± 0,75	20,2 ± 0,77
Koll. I innerhalb 7d nach NTX	32,98 ± 1,08	12,65 ± 0,68	30,98 ± 1,47	10,53 ± 0,56	19,98 ± 0,98
Koll. I 3 Wochen nach NTX	33,78 ± 0,92	12,58 ± 0,74	31,28 ± 1,48	10,85 ± 0,75	19,67 ± 0,68
Koll. II vor NTX	33,96 ± 0,77	12,8 ± 0,73	31,78 ± 1,72	10,24 ± 0,42	19,18 ± 0,86
Koll. II innerhalb 7d nach NTX	33,78 ± 1,0	12,78 ± 0,65	31,36 ± 1,23	9,98 ± 0,32	19,05 ± 0,69
Koll. II 3 Woche nach NTX	33,85 ± 0,78	12,93 ± 0,55	31,77 ± 1,32	10,12 ± 0,52	19,18 ± 0,75

Koll. III vor NTX	32,63 ± 0,87	13,09 ± 0,35	31,17 ± 1,33	10,91 ± 0,83	18,77 ± 0,49
Koll. III innerhalb 7d nach NTX	33,04 ± 0,98	13,06 ± 0,39	31,87 ± 1,33	10,37 ± 0,44	18,93 ± 0,46
Koll. III 3 Wochen nach NTX	33,04 ± 1,0	12,91 ± 0,35	31,41 ± 1,25	10,8 ± 0,87	18,89 ± 0,61

* Die Werte stammen aus durchflußzytometrischen Messungen. Die MFI hat keine Einheit.

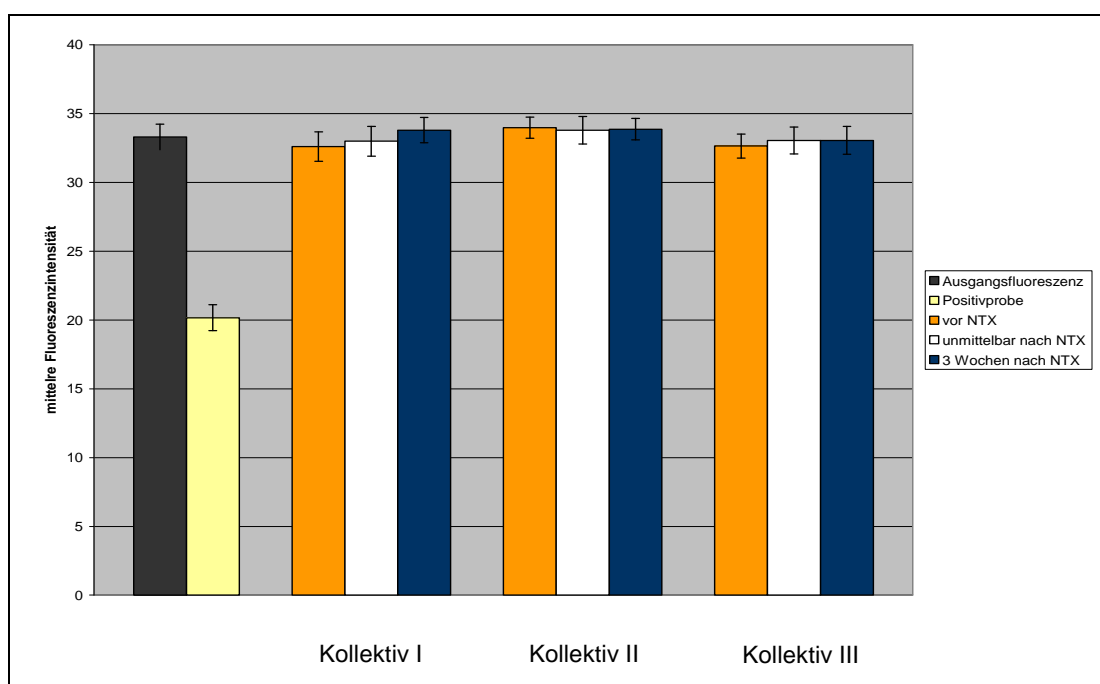


Abbildung 20: Vergleich der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität für das monozytäre Antigen CD63 der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen Patientenserum aller drei Kollektive, der Ausgangsfluoreszenzintensität und der Positivprobe.

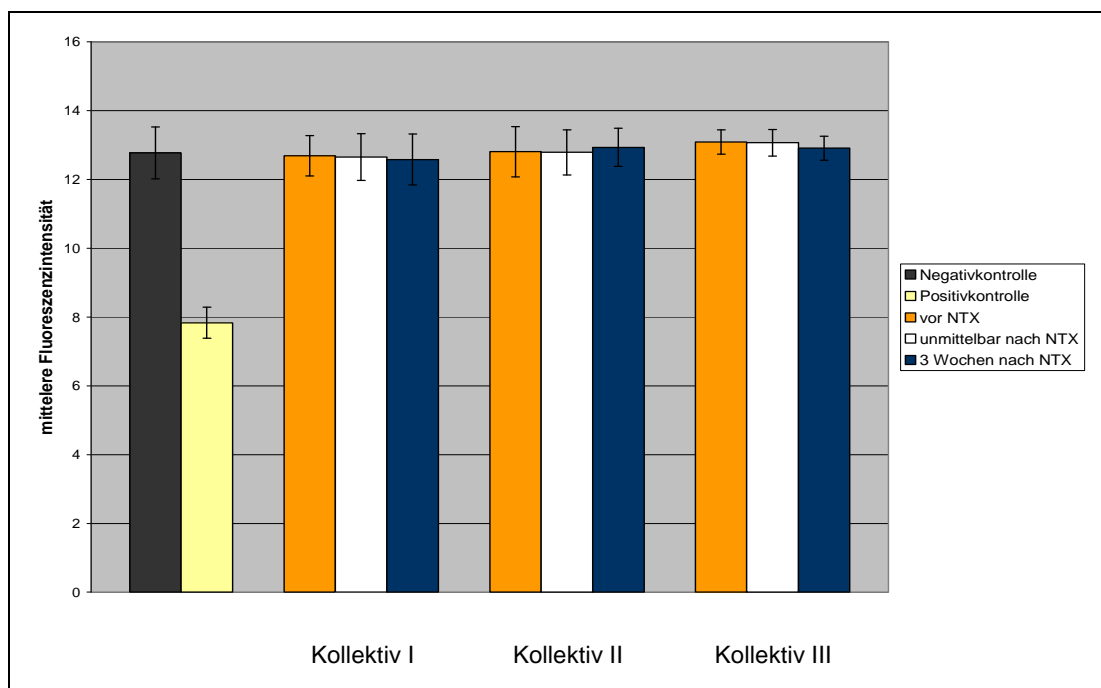


Abbildung 21: Vergleich der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität für das monozytäre Antigen CDw92 der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen Patientenseren aller drei Kollektive, der Ausgangsfluoreszenzintensität und der Positivprobe.

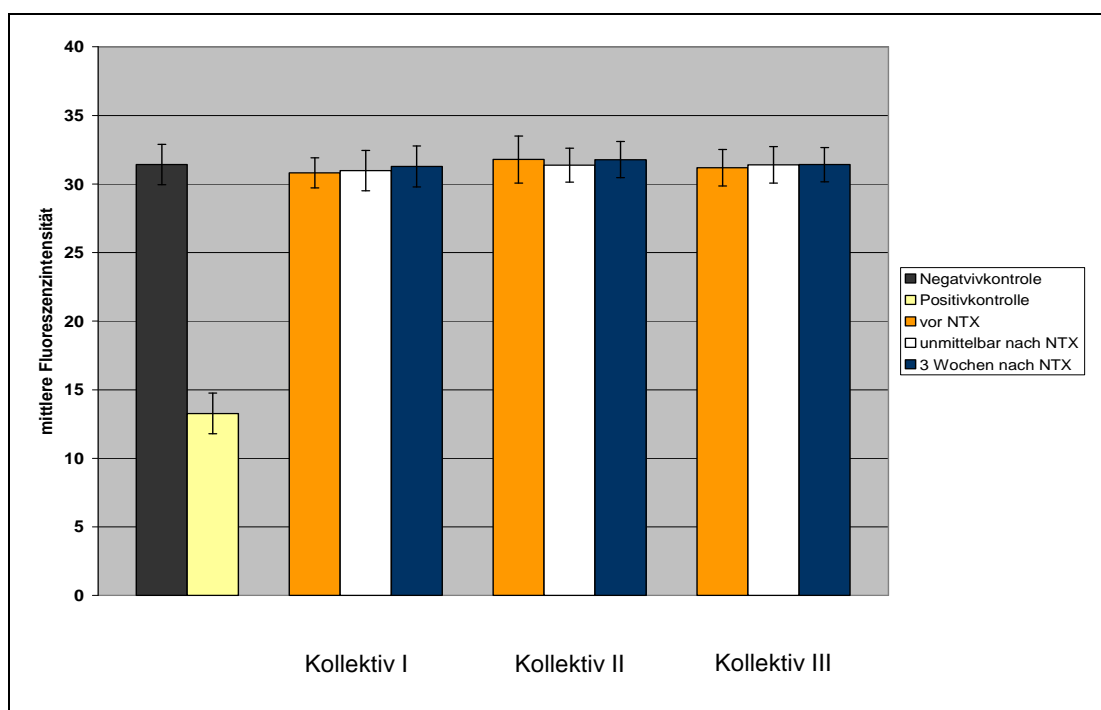


Abbildung 22: Vergleich der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität für das monozytäre Antigen CD93 der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen Patientenseren aller drei Kollektive, der Ausgangsfluoreszenzintensität und der Positivprobe.

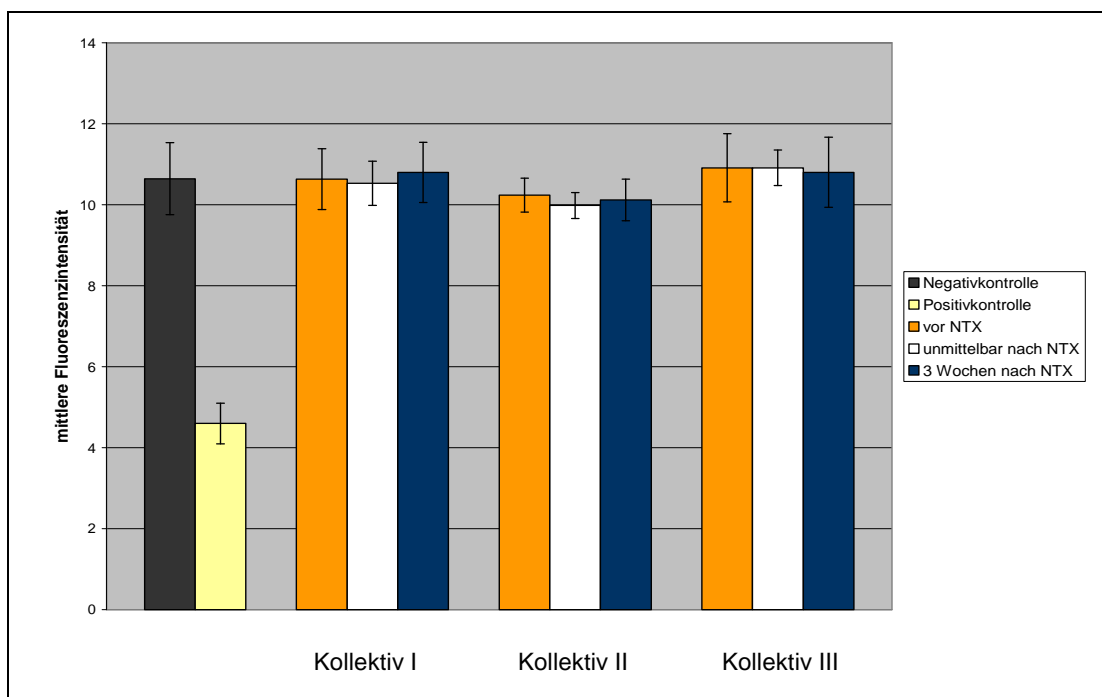


Abbildung 23: Vergleich der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität für das monozytäre Antigen CD102 der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen Patientenseren aller drei Kollektive, der Ausgangsfluoreszenzintensität und der Positivprobe.

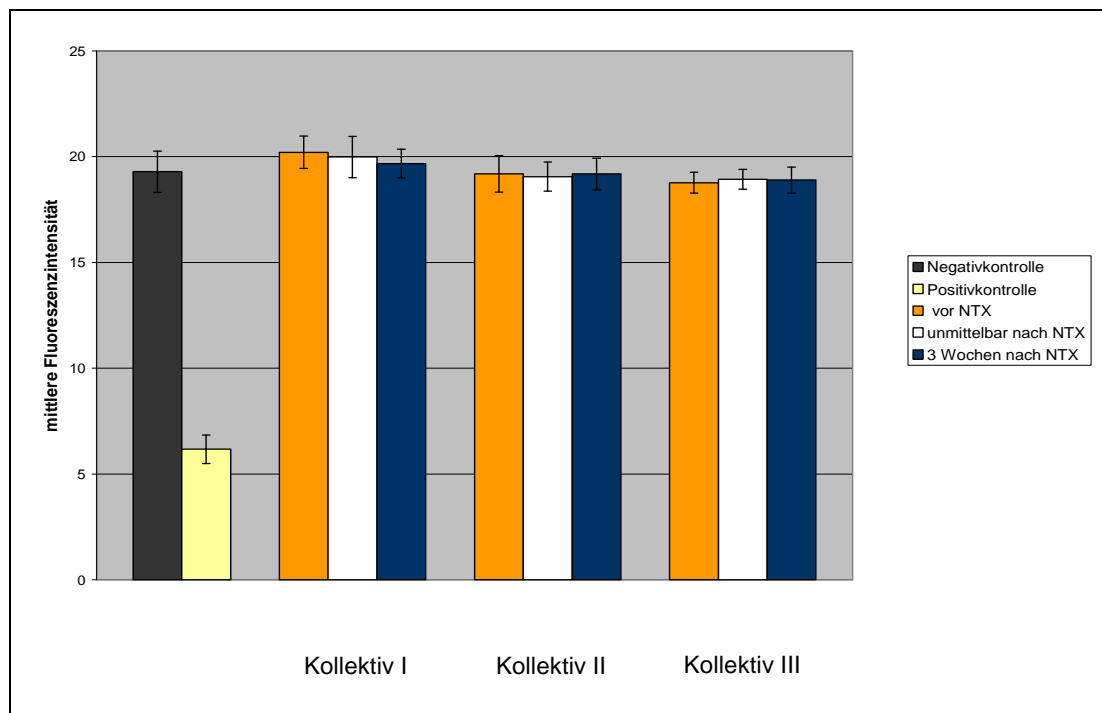


Abbildung 24: Vergleich der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität für das monozytäre Antigen CD151 der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen Patientenseren aller drei Kollektive, der Ausgangsfluoreszenzintensität und der Positivprobe.

6 Diskussion

Die HLA-Antigene stellen die Haupt-Transplantationsantigene dar. Sie sind in ihrer Ausprägung und ihrem Polymorphismus weitgehend erforscht. Bei Transplantation besteht ein Idealzustand, wenn ein Patient eine komplett AB0- und HLA-kompatible Niere erhält. Aufgrund des Polymorphismus des HLA-Systems ist dies nur bei 20% der Patienten realisierbar. Für die restlichen 80% muss entsprechend der Richtlinien von Eurotransplant eine Minimalübereinstimmung von je einem HLA-B- und HLA-DR-Merkmal oder von zwei HLA-DR-Merkmalen vorliegen (Grosse-Wild und Ottinger, 1998). Um abzuklären, ob der Organempfänger HLA-Ak im Serum hat, wird vor jeder Transplantation der HLA Antikörperstatus des Organempfängers bestimmt. Darüber hinaus erfolgt vor jeder Transplantation die HLA-Typisierung des Spenders und des Empfängers und es wird ein aktueller Cross-Match durchgeführt. Das Ergebnis des Cross-Match Testes determiniert den weiteren Transplantationsablauf. Ein positives Resultat weist beim Organempfänger auf HLA-Ak hin, die mit dem transplantierten Organ des Organspenders reagieren können, wodurch die Transplantation kontraindiziert ist. Durch dieses Verfahren konnten Abstoßungsreaktionen und damit der Verlust des transplantierten Organs reduziert werden.

In der vorliegenden Arbeit fehlten bei den ausgewählten Patienten, erfasst durch den LCT, HLA-Ak, dennoch kam es zur akuten Rejektion oder verzögerten Funktionsaufnahme der transplantierten Niere. Wie klinische Erfahrungen bei Transplantationen zeigen, treten Abstoßungsreaktionen auch bei Patienten auf, die in den HLA-Antigenen mit dem Spender vollkommen übereinstimmen (Opelz, 2005). Hieraus lässt sich auf weitere Transplantationsantigene schließen, die so genannten non-HLA-Antigene. Stimmen diese nicht überein, so stellen sie bei der allogenen Nierentransplantation, wie auch bei Transplantation anderer Organe ein bisher nicht vorhersagbares Restrisiko für eine Abstoßungsreaktion bei den Patienten dar.

Die ersten non-HLA-Antigene die mit einer antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion von HLA-identischen Nierentransplantaten beschrieben wurden, waren polymorph strukturierte Antigene, die ausschließlich von

Endothelzellen und Monozyten exprimiert werden. Diese Antigene werden auch als Endothel-Monozyten-System (EM) bezeichnet (Moraes et al., 1977). Die nachgewiesenen non-HLA-Ak richteten sich dabei gegen die von Endothelzellen und Monozyten exprimierten Antigene (Cerilli et al., 1983; van der Woude et al., 1995). Bis heute ist es nicht gelungen einzelne Antigene aus diesem System und die antigenen Determinanten, gegen welche sich diese non-HLA-AK richten, zu spezifizieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe der Durchflußzytometrie non-HLA-Ak gegen die von Monozyten exprimierten Oberflächenantigene CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 in Seren nierentransplantierter Patienten mit akuter Abstoßungsreaktion, verzögerter Funktionsaufnahme und normaler Funktionsaufnahme des Transplantates vor und nach NTX nachzuweisen.

6.1 Non-HLA-Ak und Abstoßungsreaktionen

Die Rolle von non-HLA-Ak bei Abstoßungsreaktionen wird nicht nur nach NTX, sondern auch nach Herz-, Lungen- und Knochenmarktransplantationen in der Literatur beschrieben und diskutiert (Joyce et al., 1988; Boudailliez et al., 1992; Crisp et al., 1994; Al- Hussein et al., 1995). Brasile und Mitarbeiter konnten bei herztransplantierten Patienten mit einer hyperakuten Abstoßungsreaktion ihres Transplantates, Antikörper gegen Endothelzell- und Monozytenantigene nachweisen (Brasil et al., 1985, 1986). Wie durch Experimente und Studien belegt werden konnte, sind auch bei der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie (TVP), die das Bild einer chronischen Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation (HTX) darstellt, non-HLA-Ak beteiligt (Rose, 2000). Mit Hilfe von Westernblot und Durchflußzytometrie konnten in Seren von Patienten mit HTX und anschließender TVP Antikörper gegen verschiedene Endothelantigene nachgewiesen werden (Dunn et al., 1992; Ferry et al., 1997; Fredrich et al., 1999). In einem Rattenmodell wurde die Rolle von non-MHC-Antigenen und non-MHC-Ak bei chronischen Abstoßungsreaktionen, wie z.B. der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie bestätigt (Derhaag et al., 2000; Wu et al., 2002). Auch bei der Pathogenese des Bronchiolitis obliterans

Syndroms (BOS) nach Lungentransplantation als Bild der chronischen Abstoßungsreaktion spielen non-HLA-Ak eine Rolle. Bei 31 % der BOS Patienten konnten non-HLA-Ak gegen Epithelzellen der Atemwege nachgewiesen werden (Jaramillo et al., 2001).

Nach Knochenmarktransplantationen zwischen HLA-identischen Spender und Empfänger treten vereinzelt Graft-versus-Host-Abstoßungsreaktionen auf. Diese werden hauptsächlich durch die Übertragung immunkompetenter T-Zellen des Spenders, welche Antigene des Empfängers als fremd erkennen, hervorgerufen. Es sind non-HLA-Antigene bekannt, welche hierbei wichtige Zielstrukturen für T-Zellen darstellen (Goulmy et al., 1996).

Ferry und Mitarbeiter fanden im Vergleich zu den erhobenen Befunden bei Herztransplantation auch bei nierentransplantierten Patienten mit chronischer Abstoßung Ak gegen endotheliale Antigene. In der Kontrollgruppe mit akuter Rejektion und normaler Funktionsaufnahme konnten sie hingegen keine non-HLA-Ak gegen Endothelzellen vor und nach NTX nachweisen (Ferry et al., 1997).

Sumitran-Karruppan hingegen berichtete über einen Fall, bei welchem eine hyperakute Abstoßungsreaktion bei zwei aufeinander folgenden Nierenallotransplantationen und ein früher Verlust des dritten Transplantates bei ein und der gleichen Patientin auftraten. Hierbei wurden non-HLA-Ak gegen Endothelzellen nachgewiesen, welche bereits ein Jahr vor Transplantation vorhanden waren. Auch Perry und Mitarbeiter wiesen non-HLA-Ak vor Transplantation gegen endotheliale Antigene nach. Die in der Literatur aufgeführten Nachweise von non-HLA-Ak vor Transplantation waren meistens mit einer hyperakuten Rejektion vergesellschaftet (Sumitran-Karuppan et al., 1997; Perry et al., 1998; Rodriguez et al., 2000).

Opelz konnte mit Hilfe der Collaborative Transplant Study zeigen, dass durch bestimmte Ak chronische Abstoßungsreaktionen nach NTX ausgelöst werden, die nicht, wie bislang angenommen ausschließlich mit HLA-Strukturen auf Lymphozyten reagieren, sondern sich gegen andere Gewebestrukturen richten. Diese Antikörper rufen entweder selbst eine Abstoßung des Organs hervor oder verweisen auf ein besonders aktives Immunsystem des Patienten, welches durch Reaktionen gegen so

genannte non-HLA-Antigene eine Abstoßung bewirken kann. Es fanden sich Hinweise darauf, dass diese Immunreaktion auch bei Transplantationen von nicht-verwandten Spendern auftreten (Opelz, 2005).

Bei von Lieb durchgeführten Untersuchungen mit der Frage nach non-HLA-Ak gegen die Adhäsionsmoleküle CD29, CD31, CD36, CD49e und CD49f in Seren von nierentransplantierten Patienten, konnte ein Expressionsanstieg des monozytären Antigens CD36 beobachtet werden. Genaue Experimente ließen auf das Vorhandensein eines löslichen Mediators in den Seren von niereninsuffizienten Patienten schließen, welcher vermutlich eine Freisetzung von präformierten CD36-Molekülen aus Vesikeln in Monozyten bewirkt (Lieb, 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnten bei keinem/ -er Patienten/ -in aus den drei untersuchten Patientenkollektiven non-HLA-Ak in prä- und postoperativen Seren nachgewiesen werden, die gegen Epitope auf den Adhäsionsmolekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 gerichtet waren, die durch die mAk H5C6, VIM 15, X-2, B-T1 und 14A2H1 vorgegeben worden sind. Im ersten und zweiten Patientenkollektiv waren Patienten/ -inen zusammengefasst, die nach der Nierentransplantation eine akute Rejektion entwickelten oder eine verzögerte Funktionsaufnahme der transplantierten Niere zeigten. Der fehlende Nachweis von non-HLA-Ak gegen die aufgelisteten Epitope weist darauf hin, dass die beobachtete akute Rejektion bzw. die verzögerte Funktionsaufnahme der transplantierten Niere nicht durch non-HLA-Ak ausgelöst wird, die mit den untersuchten Epitopen reagieren. Für diese Rejektion und verzögerte Funktionsaufnahme müssen andere Ursachen verantwortlich sein. Hier sind vielfältige Ursachen denkbar. Letztendlich ist trotz des fehlenden Nachweises von non-HLA-Ak in dieser Arbeit eine Beteiligung von non-HLA-Ak bei den gefundenen Rejektionen bzw. verzögerten Funktionsaufnahme nicht ausgeschlossen. Derartige Ak müssten allerdings andere Epitope auf den Molekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 detektieren oder aber gegen ganz andere Moleküle gerichtet sein, so dass das Spektrum der eingesetzten mAk erweitert werden müsste, um derartige non-HLA-Ak mit den in der Arbeit gewählten Blockierungsstudien nachzuweisen.

Weiterhin konnten bei den durchgeführten Untersuchungen keine Expressionsanstiege für die monozytären Antigene im Vergleich zu CD36 beobachtet werden. In der Literatur sind für die Antigene CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 keine Speichervesikel wie bei dem CD36 beschrieben worden (Tassone et al., 1998; Huh et al., 1996).

6.2 Genpolymorphismus und mögliche Modifikationen der untersuchten Epitope der monozytären Adhäsionsmoleküle CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151

Non-HLA-Ak können gegen polymorphe Strukturen gerichtet sein, die durch Genpolymorphismus entstehen. Für HLA-Antigene ist ein extrem hoher Polymorphismus charakteristisch. Über die Vielgestaltigkeit von non-HLA-Antigenen ist hingegen wenig bekannt. Maruya und Mitarbeiter untersuchten 14 Adhäsionsmoleküle hinsichtlich ihres Polymorphismus bei Patienten mit einer Graft-versus-Host-Reaktion nach HLA-identischer Knochenmarktransplantation. Für die Adhäsionsmoleküle CD2, CD31, CD42, CD49b, CD54, CD62L und CD102 konnte ein gewisser Polymorphismus nachgewiesen werden. Bei den Molekülen CD31, CD49b und CD62L korrelierte der Polymorphismus signifikant mit einer Graft-versus-Host-Reaktion. Hierbei präsentierten die körpereigenen MHC-Klasse I Moleküle des Knochenmarkempfängers Peptidfragmente, die von den Molekülen CD31, CD49b und CD62L abstammen. Durch den Genpolymorphismus, der für diese Moleküle vorlag, wurden die Peptidfragmente von den T-Zellen des Knochenmarkspenders als fremd erkannt und lösten somit die gefürchtete Graft-versus-Host-Reaktion im Knochenmarkempfänger aus (Maruya et al., 1998). Durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass der non-HLA-Polymorphismus das Risiko von Komplikationen nach allogener hämapoetischer Stammzelltransplantation erhöht (Mullighan et al., 2004). Bates und Mitarbeiter untersuchten in einer Studie die Vielfältigkeit und Natur von Zielantigenen in Seren von Patienten mit TVP. Dabei konnten sie bei non-HLA-Antigenen oder Autoantigenen, die in die Genese der Vaskulopathie involviert sind, einen hohen Polymorphismus nachweisen

(Bates et al., 2003). Weiterhin wurden Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus des NK-Rezeptors, der Minor-HLA-Antigene und dem Transplantationsergebnis beobachtet. Joyce und Mitarbeitern gelang mit einem Affenserum (MHK-I) der Nachweis eines polymorphen non-MHC-Antigens, welches von Glomerulumzellen, peritubulären Kapillaren und venösen Endothel im renalen Kortex exprimiert wird (Joyce et al., 1992).

In den durchgeführten Untersuchungen konnten keine non-HLA-Ak gegen ausgewählte Epitope auf monozytären Adhäsionsmolekülen in den Seren nierentransplantierter Patienten nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Ak wahrscheinlich Epitope detektieren, die bei den hier untersuchten Probanden homogen strukturiert sind. Die Homogenität deutet darauf hin, dass die Epitope in Proteinregionen liegen, deren zugehörigen kodierenden Genregionen von Mutationen wenig betroffen sind. Weiter gefasst könnte sich hieraus ergeben, dass die Gensequenzen für CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 mit nur einer geringen Frequenz polymorph aufgebaut sind. Die Hypothese wird durch Literaturdaten unterstützt, denn nur für das Gen CD151 ist bisher eine polymorphe Struktur bedingt durch Mutationen beschrieben worden (Whitlock et al., 2001; Karamatic et al., 2004).

Heterogen strukturierte Epitope können alternativ auch aus verschiedenartigen posttranslationalen Modifikationen hervorgehen. Posttranslationale Modifikationen sind chemische Prozesse die nach der Translation am Protein vorgenommen werden. Die häufigsten Vorgänge sind Phosphorylierungen, Acetylierungen und Glykosylierungen, bei welcher O- und N-Glyosylierung unterschieden werden (Koolmann, 1997). Für Struktur und Funktion vieler Proteine sind diese Modifizierungen von entscheidender Bedeutung. Glykosylierte Proteine können z.B. durch angeheftete besonders immunogen wirkende Sialinsäure eine verstärkte negative Ladung bekommen und eine definierte Zunahme ihrer molekularen Masse erlangen (Rademacher et al., 1988; Kobata, 1992). Die hier untersuchten Adhäsionsmoleküle bieten strukturell mehrere Möglichkeiten, um posttranslational modifiziert zu werden. So können bei CD63 postranslational N-Glykosierungen stattfinden und zusätzlich Poly-N-

Lactosamin-Gruppen hinzugefügt werden, wie dies z.B. bei der Reifung von DC beobachtet wurde (Engering et al., 2003). CD102 und CD151 können an ihrer extrazellulären Domäne N-glykosyliert werden (Fitter et al., 1995). Bei CD93 sind O- und N-Glykosylierungen, bei CDw92 hingegen Autophosphorylierungen als posttranslationale Modifikationen bekannt (Nepomuceno et al., 1998, 1999; Angelisova et al., 1995). Die posttranslationalen Modifizierungen ereignen sich durch spezifische Enzyme intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum, direkt im Cytosol oder im Golgi-Apparat. Darüber hinaus können sie auch im extrazellulären Kompartiment auftreten. Da die Lage für die ausgewählten Epitope auf den einzelnen Adhäsionsmolekülen nicht bekannt ist, können sie entweder von posttranslationalen Modifikationen ausgenommen sein oder aber einem posttranslationalen Prozess unterliegen. Im zweiten Fall erzeugt der posttranslationale Prozess keine heterogene Struktur, die immunogen wirkt, denn in der vorliegenden Arbeit konnten keine Antikörper gegen die vorgegebenen Epitope auf den Molekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 gefunden werden. Das Fehlen der Antikörper deutet darauf hin, dass die potentiell möglichen posttranslationalen Modifikationen zu einer einheitlichen Struktur bei den untersuchten Probanden führen. Da die posttranslationalen Modifikationen enzymatisch gesteuert werden, könnte die einheitliche Struktur darauf hin deuten, dass die Enzymausstattung und die Enzymaktivität für die posttranslationalen Modifikationen bei den Probanden ähnlich sind.

6.3 Diskussion der Durchflußzytometrie als Methode der Wahl zum Nachweis von non-HLA-Antikörpern

Der fehlende Nachweis von non-HLA-Ak gegen die definierten Epitope auf den Molekülen CD63, CDw92, CD93, CD102 und CD151 in den Seren der Probanden könnte allerdings auch auf einer limitierten Nachweisgrenze der Detektionsmethode beruhen. In der Arbeit wurde die Durchflußzytometrie als Nachweisverfahren für non-HLA-Ak verwendet. Als Alternativverfahren zur Durchflußzytometrie bieten sich der Agglutinationstest, ELISA, Westernblot

und Immundiffusionstechniken an. Gegenüber den aufgezählten Methoden hat die Durchflußzytometrie den Vorteil, dass sie relativ schnell durchgeführt werden kann und das Potential hat, einzelne Zellpopulationen separat zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde nach Epitopen für non-HLA-Ak auf spezifisch monozytär exprimierten Adhäsionsmolekülen gesucht. Derartige Analysen lassen sich am ehesten mit dem Durchflußzytometer verwirklichen. Ein weiterer hoch einzuschätzender Vorteil der Durchflußzytometrie ist die enorme Sensitivität. Die in der Arbeit durchgeführten Verdünnungsreihen zeigten, dass unmarkierte mAk bis zu einer Konzentration von 0,00125 mg/ ml die fluoreszenzmarkierten mAk in ihrer Bindung an das ausgewählte Adhäsionsmolekül blockieren können. Dieser sehr niedrige Wert deutet auf eine hohe Sensitivität und große Nachweiskapazität hin. Ein systemischer Vergleich der Nachweisgrenze für non-HLA-Ak mit den anderen erwähnten Verfahrensmethoden ist in der Arbeit allerdings nicht durchgeführt worden. Die Vorteile der Durchflußzytometrie für den Nachweis von non-HLA-Ak wurden ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beschrieben und die Methode wird daher zunehmend angewandt (Kern et al., 1998; Hoffmeister et al., 2003). Die in der Arbeit gefundene hohe Sensitivität der Durchflußzytometrie beim Nachweis von non-HLA-Ak deutet darauf hin, dass der fehlende Nachweis von non-HLA-Ak gegen die ausgewählten Epitope nicht auf mangelnder Sensitivität des Detektionsverfahrens zurückzuführen ist. Vielmehr ist die hohe Sensitivität eine richtungsweisende Voraussetzung, um das durchflußzytometrische Verfahren für den routinemäßigen Nachweis von non-HLA-Ak anzuwenden. Die erbrachten Ergebnisse führen jedoch zu der Schlussfolgerung, dass die gewählten mAk H5C6, VIM15, X-2, B-T1 und 14A2H1 für den Routineeinsatz wahrscheinlich ungeeignet sind, weil in den untersuchten Seren keine non-HLA-Ak gefunden worden sind, die spezifisch gegen die von den mAk vorgegeben Epitope gerichtet waren. Für den Routineeinsatz müssen weitere mAk ausgetestet werden und die Analysen auf andere potentielle Antigene, wie z.B. Adhäsionsmoleküle auf Nierenendothelzellen ausgedehnt werden. Vielleicht können dadurch bedeutsame Epitope für non-HLA-Ak charakterisiert werden und die

zugehörigen kodierenden Bereiche in den Genen lokalisiert werden, so dass diese bei der Wahl des Nierenorganspenders/ -empfängers berücksichtigt werden. Letztendlich könnte die dann verbesserte Auswahl dazu beitragen, Abstoßungsreaktionen weiter zu minimieren.

7 Schlussfolgerungen

Die einzelnen Ergebnisse der Arbeit lassen folgende Schlussfolgerungen zu: Aufgrund hoher Sensitivität, schneller Durchführbarkeit, Reproduzierbarkeit und der Möglichkeit Zellpopulationen getrennt zu analysieren, eignet sich die Durchflußzytometrie besonders gut, um non-HLA-Ak in den Seren nachzuweisen. Diese Methode sollte in der Routine bevorzugt zum Nachweis von non-HLA-Ak eingesetzt werden.

Die mAk H5C6, VIM15, X-2, B-T1 und 14A2H1 definieren auf den monozytär exprimierten Adhäsionsmolekülen Epitope mit geringer Bedeutung für non-HLA-Ak. Anscheinend sind diese Epitope bei den in der Arbeit untersuchten Nierenspende und Nierenempfänger homogen strukturiert, wodurch der gefundene fehlende Nachweis von non-HLA-Ak mit Spezifität für die untersuchten Epitope erklärt werden könnte. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Epitope Bereiche im jeweils zugehörigen Protein bestimmen, die einheitlich posttranslational modifiziert werden und keine Polymorphismen im zugehörigen kodierenden Genabschnitt aufweisen. Daraus ließe sich die Homogenität ableiten. Weiterhin weist der fehlende Nachweis von non-HLA-Ak mit Spezifität gegen die definierten Epitope darauf hin, dass die beobachteten akuten Rejektionen und verzögerte Funktionsaufnahmen bei den transplantierten Nieren im Untersuchungskollektiv nicht von derartigen non-HLA-Ak verursacht worden sind. Hierfür müssen andere Ursachen verantwortlich sein.

Da keine non-HLA-Ak gefunden worden sind, die mit den Epitopen interagieren, die durch die mAk H5C6, VIM15, X-2, B-T1 und 14A2H1 vorgegeben worden sind, erscheinen diese mAk für den Routinenachweis von non-HLA-Ak ungeeignet. Hier muss in weiteren Untersuchungen eine große Vielzahl von anderen mAk ausgetestet werden, um passende mAk zu finden.

8 Literaturverzeichnis

Al- Hussein KA, Talbot D, Proud G, Taylor RM and Shenton BK (1995): The clinical significance of post- transplantation non- HLA antibodies in renal transplantation. *Transpl.Int.* **8**: 214-220

Angelisova P, Cinek T, Josek J and Horejsi V: Association of protein kinases with the myeloid cell antigens. In: Schlossmann SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan MJ, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaws S, Silverstein R, Springer T, Tedder TF and Todd RF (eds.): *Leukocyte Typing V*. Oxford University Press, Oxford (1995) S. 997-999

Ashman LK, Aylett, GW, Mehrabani PA, Bendall LJ, Niutta S, Cambareri AC, Cole SR, Berndt MC (1991): The murine monoclonal antibody, 14A2.H1, identifies a novel platelet surface antigen. *Brit. J. Haemat.* **79**: 263-270

Auchincloss H and Sachs DH: Transplantation and Graft Rejection. In: Paul WE (eds.): *Fundamental Immunology*. Raven Press, Ltd. New York (1993) S.1099- 1132

Azorsa DO and Hildreth JEK: CD63 cluster workshop report. In: Schlossmann SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan MJ, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaws S, Silverstein R, Springer T, Tedder TF and Todd RF (eds.): *Leukocyte Typing V* 984. Oxford University Press, Oxford (1995) S. 1352-1353

Bates RL, Frampton G, Rose ML and Murphy JJ (2003) High diversity of non- human leukocyte antigens in transplant- associated coronary artery disease. *Transplantation* **75**: 1347-1350

Becton Dickinson Biosciences, Becton Dickinson PharMingen (2000): CD93 in: *Human Cell Surface Molecules*

Boudailliez B, Jean G and Niaudet P (1992): Non anti- HLA antibodies and early irreversible rejection after kidney transplantation in children. *Press Med* **2**: 1987-1988

Brasile L, Rodman E, Shield CF 3rd, Clark J and Cerilli J (1986): The association of antivasular endothelial cell antibody with hyperacute rejection: a case report. *Surgery* **99**: 637-640

Brasile L, Zerbe T, Rabin B, Clarke J, Abrams A, Cerilli J (1985): Identification of the antibody to vascular endothelial cells in patients undergoing cardiac transplantation. *Transplantation* **40** :672-675

Braun M, Eppinger T: Immunsystem. In: Renz- Polster H, Braun J (Hrsg.): Basislehrbuch Innere Medizin, *Urban & Fischer Verlag* (2000) S. 386-389

Carpenito C, Pyszniak AM and Takei F (1997): ICAM- 2 provides a costimulatory signal for T cell stimulation by allogenic class II MHC. *Scand J Immunol* **45**: 248- 254

Cerilli J, Brasile L, Galouzis T, Lempert N and Clarke J (1985) : The vascular endothelial cell antigen system. *Transplantation* **39** : 286-289

Crisp SJ, Dunn MJ, Rose ML, Barbir M and Yacoub MH (1994) : Antiendothelial antibodies after heart transplantation : the accelerating factor in transplant- associated coronary artery disease ? *J Heart Lung Transplant* **13** : 81-91

Damle NK, Klussman K and Aruffo A (1992) Intercellular adhesion molecule- 2, a second counter- receptor for CD11a/ CD18 (leukocyte function- associated antigen- 1), provides a costimulatory signal for T- cell receptor- initiated activation of human T cells. *J Immunol* **148**: 665- 671

de Fougerolles AR, Stacker SA, Schwarting R and Springer TA (1991) Characterization of ICAM- 2 and evidence for a third counter- receptor for LFA- 1. *J Exp Med* **174**: 253- 267

Derhaag JG, Duijvestijn AM, Damoiseaux JG and van Breda Vriesman PJ (2000): Effects of antibody reactivity to major histocompatibility complex (MHC) and non- MHC alloantigens on graft endothelial cells in heart allograft rejection. *Transplantation* **69**: 1899-1906

Deutsche Stiftung Organtransplantation: www.dso.de

Dreikorn K: Dialyse oder Nierentransplantation. In: Dreikorn K (Hrsg.): Leben mit neuer Niere, Pabst Lengerich (1994) S. 84-88

Dunn MJ, Crisp SJ, Rose ML, Taylor PM and Yacoub MH (1992): Anti- endothelial antibodies and coronary artery disease after cardiac transplantation. *Lancet*. **339**: 1566-1570

Engering A, Kuhn L, Fluitsma D, Hoefsmit E and Pieters J (2003): Differential post-translational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells. *Eur. J. Biochem.* **270**: 2412-242

Evans RW, Manninen DL, Garrison LP, et al. (1985): The quality of life of patients with end-stage-renal disease. *N-Engl. J. Med.* **312**: 553-559.

Ferry BL, Welsh KI, Dunn MJ, Law D, Proctor J, Chapel H, Yacoub MH and Rose ML (1997): Anti- cell surface endothelial antibodies in sera from cardiac and kidney transplant recipients: association with chronic rejection. *Transpl Immunol.* **5**: 17-24

Fredrich R, Toyoda M, Czer LS, Galfayan K, Galera O, Trento A, Freimark D, Young S and Jordan SC (1999): The clinical significance of antibodies to human vascular endothelial cells after cardiac transplantation. *Transplantation* Vol. **67**: 385-391

Fitter S, Tetaz TJ, Berndt MC, Ashman LK (1995): Molecular cloning of cDNA encoding a novel platelet-endothelial cell tetra-span antigen, PETA-3. *Blood* **86**:1348

Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen Grathwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC and van Rood JJ (1996): Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA- identical donors and recipients and the development of graft- versus- host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* **334**: 281-285

Grosse-Wild H und Ottinger H (1998): Immunologische Aspekte der Transplantation. *Essener Unikate* **10**: 20-33

Guan E, Burgess WH, Robinson SL, Goodman EB, McTigue KJ and Tenner AJ. (1991): Phagocytic cell molecules that bind the collagen-like region of C1q: involvement in the C1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **266**:20345

Hemler ME (2001): Specific tetraspanin functions. *J. Cell Biol.* **155**:1103-1107

Hoffmeister B, Kiecker F, Tesfa L, Volk HD, Picker LJ and Kern E (2003): Mapping T cell epitopes by flow cytometry. *Methods* **29**: 270-281

Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, Silverstein RL(1996):Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation
Blood **87**:2020-8

Janeway Ch.A, Travers P: Transplantatabstoßung: Reaktionen gegen Alloantigene. In: Immunologie (2.Auflage): *Spektrum Verlag* (1997) S. 479-485

Jaramillo A, Naziruddin B, Zhang L, Reznik SI, Smith MA, Aloush AA, Trulock EP, Patterson GA and Mohanakumar T (2001): Activation of human airway epithelial cells by non- HLA antibodies developed after lung transplantation: a potential etiological factor for bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* Vol. **71**: 966-976

Joosten SA, van Kooten C (2005): Non-HLA humoral immunity and chronic kidney-graft loss. *Lancet* **365**:1522-1523

Joyce S, Flye MW, Mohanakumar T (1988): Characterization of kidney cell-specific, non-major histocompatibility complex alloantigen using antibodies eluted from rejected human renal allografts. *Transplantation* **46**:362-369

Joyce S, Mathew JM and Mohanakumar T (1992): A polymorphic human kidney- specific non- MHC alloantigen. Its possible role in tissue-specific allograft immunity. *Transplantation* **53**: 1119-1127

Karamatic Crew V, Burton N, Kagan A, Green CA, Levene C, Flinter F, Brady RL, Daniels G and Anstee DJ (2004): CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood* **104**: 2217-2223

Kern F, Surel JP, Brock C, Freistedt B, Radtke H, Scheffold A, Blasczyk R, Reinke P, Schneider-Mergener J, Radbruch A, Walden P und Volk HD (1998): T- cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat. Med* **4**: 975-978

Kiefel V und Greinacher A: HLA und Transplantation. In: Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (2005): 101-111

Kobata A (1992): Structure and function of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J. Biochem.* **209**: 483-501

Koolmann J, Röhm KH: In: Taschenatlas der Biochemie, *Thieme Verlag* (1997) S. 216

Krautzig S: Niere. In: Renz- Polster H, Braun J (Hrsg.): Basislehrbuch Innere Medizin, *Urban & Fischer Verlag* (2000) S. 894-905

Lieb W (2002): Einfluss von vor und nach Nierentransplantation gewonnenen Seren auf die Expression des CD36 Antigens auf Monozyten. In: Dissertationsschrift: Suche nach non-HLA-Ak in Seren von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung:46-53

Maecker HT, Todd SC and Levy S (1997): The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* **11**:428–442.

Maruya E, Saji H, Seki S, Fujii Y, Kato K, Kai S, Hiraoka A, Kawa K, Hoshi Y, Ito K, Yokoyama S and Juji T (1998) Evidence that CD31, CD49b and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants. *Blood* **92**: 2169-2176.

Mai I, Pickl WF, Stöckl J, Majdic O, Mellors A, de Smet W, Xu h, Peters JH and Knapp W: CD93 (group 11) cluster workshop report. In: Schlossmann SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan MJ, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaws S, Silverstein R, Springer T, Tedder TF and Todd RF (eds.): Leukocyte Typing V 984. Oxford University Press, Oxford (1995) S. 986- 988

Majdic O, Mai I, Pickl WF, Stockinger H and Knapp W: CDw92 (group 9) cluster workshop report. In: Schlossmann SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan MJ, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaws S, Silverstein R, Springer T, Tedder TF and Todd RF (eds.): Leukocyte Typing V 984. Oxford University Press, Oxford (1995) S. 984- 985

McKenna R.M., Takemoto S.K., Terasaki P.I.(2000): Anti-HLA Antibodies after solid Organ Transplantation. *Transplantation* **69**: 319-326

Miltenburg AM, Meijer- Paape ME, Weening JJ, Daha MR, van Es LA and van der Woude FJ (1989) Induction of antibody- dependent cellular cytotoxicity against endothelial cells by renal transplantation. *Transplantation* **48**: 681- 688

Moraes JR and Stastny P (1977): A new antigen system expressed in human endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* **60**: 449-454

Mullighan C, Heatley S, Doherty K, Szabo F, Grigg A, Hughes T, Schwarer A, Szer J, Tait, To B and Bardy P (2004): Non- HLA immunogenetic polymorphisms and the risk of complications after allogenic hemopoietic stem- cell transplantation. *Transplantation* **77**: 587-596

Nepomuceno RR and Tenner AJ (1998): C1qRp, the C1q Receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *The Journal of Immunology* **160**: 1929-1935

Nepomuceno RR, Ruiz S, Park M and Tenner AJ (1999): C1qR_P Is a Heavily O-Glycosylated Cell Surface Protein Involved in the Regulation of Phagocytic Activity. *The Journal of Immunology* **162**: 3583-3589

Opelz G, Mytilineos J, Scherer S, Dunckley H, Trejaut J, Chapman J, Middleton D, Savage D, Fischer O, Bignon JD, et al.(1991): Survival of DNA HLA-DR typed and matched cadaver kidney transplants. The Collaborative Transplant Study. *Lancet* **338**:461-3

Opelz G (1992): Collaborative Transplant Study-10 Year Report. *Transplantation Proceedings* **24**: 2342-2355.

Opelz G, Wujjak T, Döhler B, Scherer S, Mytilineos J (1999): HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Reviews in Immunogenetics* **1**: 334-342.

Opelz G (2005): Non- HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *The Lancet* **365**: 1570-1576

Paul LC, Claas FHJ, van Es LA, Kalff MW and de Graeff J (1979) Accelerated rejection of renal allograft associated with pretransplantation antibodies directed against donor antigens on endothelium and monocytes. *New Engl J Med* **300**: 1258-1260

Perry C, Brenchley PEC, Johnson RWG and Martin S (1998) An association between antibodies specific for endothelial cells and renal transplant failure. *Transplant Immunol* **6**: 101-106

Platt JL: Antibodies in Graft Rejection. In: Wiley- Liss (Inc.): Transplantation Immunology (1995) S.113- 129

Radford KJ, Thorne RF and Hersey P (1997): Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *J. Immunol.* **158**:3353

Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA (1988): Glycobiology. *Annu Rev Biochem.* **57**: 785-838

Raffael A, Nebe CTH und Valet G: Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: Schmitz G, Rothe G (Hrsg.): Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Stuttgart, New York : *Schattauer* (1994): 3-49

Rodriguez PC, Arroyave I, Mejia G and Garcia LF (2000) Detection of alloantibodies against non- HLA antigens in kidney transplantation by flow cytometry. *Clinical Transplantation* **14**: 472-479

Rose ML (2000): Role of antibodies in transplant-associated cardiac allograft vasculopathy. *Kardiology* **89**, Suppl **9**: IX/11-5

Schmitz G, Rothe G (Hrsg.): Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Stuttgart, New York: *Schattauer* (1994)

Schreuder GMTh, Hurley CK, Marsh SGE, Lau M, Fernandez- Vina M, Noreen HJ, Setterholm M, Maiers M (2004): The HLA Dictionary 2004: a summary of HLA-A,-B,-C,-DRB1/3/4/5 and DQB1 alleles and their association with serological defined HLA-A,-B,-C,-DR and DQ antigens. *Tissue antigens* **65**: 1-55

Sincock PM, Mayrhofer G and Ashman LK (1997): Localization of the Transmembrane 4 Superfamily (TM4SF) Member PETA- 3 (CD151) in Normal Human Tissues: Comparison with CD9, CD63, and $\alpha 5\beta 1$ Integrin. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **45**: 515- 526

Solez K, Axelsen RA, Bendiktson H, et al. (1993): International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidn. Int.* **44**: 411-422

Somersalo K, Carpén O, Saksela E, Gahmberg CG, Nortamo P and Timonen T (1995) Activation of Natural Killer Cell Migration by Leukocyte Integrin- binding Peptid from Intracellular Adhesion Molecule- 2 (ICAM- 2). *J. Biol. Chem.* **270**: 8629-8636

Staunton DE, Dustin ML and Springer TA (1989) Functional cloning of ICAM- 2, a cell adhesion ligand for LFA- 1 homologous to ICAM- 1. *Nature* **339**: 61-64

Steinberger P, Szekeres A, Wille S, Stöckl J, Selenko N, Prager E, Staffler G, Madic O, Stockinger H and Knapp W (2002) Identification of human CD93 as the phagocytic C1q receptor (C1qRp) by expression cloning. *Journal of Leukocyte Biology* **71**: 133- 140

Suberbielle- Boissel C, Mougél H, Tolazzi H, Charron D and Raffoux C (1998a): Target cells of non-HLA antibodies in renal transplantation. *Transplant Proc* **30**: 2851

Suberbielle- Boissel C, Mirebeau D, Legendre C, Kssentini M, Kreis H, Charron D and Raffoux C (1998b): Target antigens of post- rejection non-HLA antibodies in renal transplantation. *Transplant Proc* **30**: 2853

Sumitran-Karuppan S, Tyden G, Reinholt F, Berg U and Moller E (1997): Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non- HLA antibodies specific for endothelial cells. *Transplant Immunol* **5**: 321-327

Tassone P, Tuccillo F, Bonelli P, Turco MC, Cecco L, Cerra M, Bond HM, Barbieri V, Venuta S. (1998): CD36 is rapidly and transiently upregulated on phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood lymphocytes. Analysis by a new monoclonal antibody (UN7). *Tissue Antigens* **51**: 671-5

Tenner AJ, Robinson SL, Borchelt J and Wright JR (1989): Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **264**:13923

Tenner AJ, Robinson SL and Ezekowitz RA (1995): Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M_r component of the C1q receptor. *Immunity* **3**: 485-493

Thiel H: Excuses of Nephrologists Not to Transplant. In: Land W, Dossetor JB (Hrsg.) Organ Replacement Therapy: Ethics, Justice and commerce. Springer- Verlag Berlin (1991) S. 353-363

van der Woude FJ and Hollander AAMJ (1998): Rejection After Kidney Transplantation: New Concepts, New Therapeutic Options. *Transpl Proc* **30**: 2419-2424

van der Woude FJ, Deckers JG, Mallat MJ, Yard BA, Schrama E, van Sasse JC and Daha MR (1995): Tissue antigens in tubulointerstitial and vascular rejection. *Kidney Int Suppl* **52**: 11-13

Wilhelm MJ, Kusaka M, Pratschke J and Tilney NL (1998): Chronic Rejection: Increasing Evidence for the Importance Allogeneic Independent Factors. *Transpl Proc* **30**: 2402-2406

Wille S, Szekeres A, Majdic O, Prager E, Staffler G, Stöckl J, Kunthaler D, Prieschl EE, Baumrucker T, Burtscher H, Zlabinger GJ, Knapp W and Stockinger H (2001) Characterization of CDw92 as a Member of the Choline Transporter- Like Protein Family Regulated Specifically on Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* **167**: 5795-5804

Whittock NV and MC Lean WH (2001): Genomic organization, amplification, fine mapping, and intragenic polymorphisms of the human hemidesmosomal tetraspanin CD151 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 425-430.

Wright MD and Tomlinson MG (1994): The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunology Today* **15**: 588-590

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ and Mathison JC (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**: 1431

Wonigeit K und Pichlmayr R : Organtransplantation in: Gemsa D, Kalden JR, Resch K (Hrsg.): Immunologie: Grundlagen-Klinik-Praxis, 4.Auflage, 1997:S. 636-660

Wu GD, Jin YS, Salazar R, Dai WD, Barteneva N, Barr ML, Barsky LW, Starnes VA and Cramer DV (2002): Vascular endothelial cell apoptosis induced by antidonor non- MHC antibodies: a possible injury pathway contributing to chronic allograft rejection. *J. Heart. Lung. Transplant.* **21**: 1174-1187

Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. D. Barz für die freundliche Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und der Möglichkeit Erfahrung auf wissenschaftlichem Gebiet zu sammeln.

Ebenso herzlich möchte ich Herrn Dr. H. Thude für seine Unterstützung als Betreuer danken. Er führte mich in die Grundlagen der Durchflußzytometrie ein, war von der Planung bis zur Durchführung und Auswertung der Ergebnisse helfend präsent und stand mir auch bei der Niederschrift ratsam zur Seite.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. V. Kiefel, Leiter der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Rostock für die Bereitstellung der Daten und den MTA's des HLA- Labors der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Rostock für die freundliche Unterstützung bei der Datenerhebung.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. M. Barten für seine Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz persönlicher Dank gebührt meinen Eltern und in memoriam meinen Großeltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und deren Interesse an meiner Arbeit und ihr Vertrauen in meine Leistung mir stets ein Ansporn waren.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. med. B. Barz und Herr Dr. rer. nat. H. Thude,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift der Verfasserin